Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005170

International filing date: 22 March 2005 (22.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP

Number: 2005-029360

Filing date: 04 February 2005 (04.02.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in

compliance with Rule 17.1(a) or (b)



日 本 国 特 許 庁 JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

2005年 2月 4日 Date of Application:

願 番 号

特願2005-029360 Application Number:

バリ条約による外国への出願 に用いる優先権の主張の基礎 となる出願の国コードと出願 番号

The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is JP2005-029360

出 願 人

チッソ株式会社 Applicant(s): 藤森工業株式会社

> 2005年 4月13日

特許庁長官 Commissioner, Japan Patent Office





```
【書類名】
               特許願
【整理番号】
               P-C50037
【あて先】
               特許庁長官
                       殿
【国際特許分類】
               C 0 7 K 1 4 / 7 4 5
【発明者】
  【住所又は居所】
               東京都中央区日本橋馬喰町一丁目4番16号 藤森工業株式会社
               本社内
               細川 和也
  【氏名】
【発明者】
  【住所又は居所】
               東京都中央区日本橋馬喰町一丁目4番16号 藤森工業株式会社
               本社内
  【氏名】
               鹿島 甲介
【特許出願人】
  【識別番号】
               0 0 0 0 0 0 2 0 7 1
  【氏名又は名称】
               チッソ株式会社
【特許出願人】
  【識別番号】
               0 0 0 2 2 4 1 0 1
  【氏名又は名称】
               藤森工業株式会社
【代理人】
  【識別番号】
               100100549
  【弁理士】
  【氏名又は名称】
                   嘉之
               川口
  【電話番号】
               0.3 - 3.669 - 6.571
  【連絡先】
               担当
【選任した代理人】
  【識別番号】
               100090516
  【弁理士】
  【氏名又は名称】
              松倉
                  秀実
【選任した代理人】
  【識別番号】
               100089244
  【弁理士】
  【氏名又は名称】
              遠山 勉
【先の出願に基づく優先権主張】
  【出願番号】
               特願2004-80950
  【出願日】
              平成16年 3月19日
【先の出願に基づく優先権主張】
  【出願番号】
               特願2004-170346
  【出願日】
               平成16年6月8日
【先の出願に基づく優先権主張】
  【出願番号】
               特願2004-217834
  【出願日】
               平成16年 7月26日
【先の出願に基づく優先権主張】
  【出願番号】
               特願2004-315631
  【出願日】
              平成16年10月29日
【手数料の表示】
  【予納台帳番号】
              192372
  【納付金額】
               16,000円
【提出物件の目録】
  【物件名】
               特許請求の範囲
```

明細書

【物件名】

 【物件名】
 図面 l

 【物件名】
 要約書 l

 【包括委任状番号】
 9712150

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

野生型トロンビンのアミノ酸を1個もしくは数個置換して得られるトロンビン誘導体であって、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下であるトロンビン誘導体。

【請求項2】

トロンビン基質結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である請求項1に記載のトロンビン誘導体。

【請求項3】

ヒルジンC末端ペプチド結合能を有する請求項lに記載のトロンビン誘導体。

【請求項4】

トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である請求項1に記載のトロンビン誘導体。

【請求項5】

ヘバリン結合能が野生型トロンビンと同程度である請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項6】

0.1 MoNaClを含む pH7.4の50 mMトリス塩酸中でトロンビン基質と37 Cで 3時間反応させたときに分解されるトロンビン基質の割合が10%以下である請求項 $1\sim5$ の何れか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項7】

トロンビン基質が血液凝固第13因子である請求項6に記載のトロンビン誘導体。

【請求項8】

トロンビン基質がトロンビンレセプター細胞外ドメインのペプチドである請求項6に記載のトロンビン誘導体。

【請求項9】

トロンビン基質がフィブリノゲンである請求項6に記載のトロンビン誘導体。

【請求項10】

0.1 MのNaClを含むpH7.4の50mMトリス塩酸に溶解した1mg/mlフィブリノゲン溶液に、終濃度が0.1mg/mlになるように加えて、37C、3時間インキュベーションしたときにフィブリンクロットを形成させない請求項 $1\sim6$ の何れか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項11】

トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である請求項1~10のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項12】

抗血液凝固カスケード効果もしくは抗血小板効果、またはその両方を有し、さらにトロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である請求項1~10のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項13】

フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である請求項1~10のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 1 4】

抗血液凝固カスケード効果もしくは抗血小板効果、またはその両方を有し、さらにフィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である請求項1~10のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項15】

トロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に2倍以上に高まった請求項1~10のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項16】

トロンビンレセプターまたは血液凝固第8因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に2倍以上に高まった請求項 $1 \sim 10$ のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項17】

野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、請求項1~16のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項18】

ヒト野生型トロンビンが配列番号2のアミノ酸配列を含む蛋白質である請求項17に記載のトロンビン誘導体。

【請求項19】

カルボキシル基が修飾された請求項1~18のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項20】

アミノ酸のエステルによってカルボキシル基が修飾された請求項 1 9 記載のトロンビン誘導体。

【請求項21】

ポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された請求項 1 9 記載のトロンビン誘導体。

【請求項22】

アミノ基を有するポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された請求項1 9記載のトロンビン誘導体。

【請求項23】

前記ポリエチレングリコールが分子量1000以下のポリエチレングリコールである、請求項21または22記載のトロンビン誘導体。

【請求項24】

カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された請求項19に記載のトロンビン誘導体。

【請求項25】

一分子当たり少なくとも3個以上のカルボキシル基が修飾された請求項19~24のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項26】

一分子当たり25個以下のカルボキシル基が修飾された請求項19~24のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項27】

少なくともB鎖25番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾された請求項19~26 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項28】

血小板のリストセチン凝集抑制能が向上した請求項 1 9 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項29】

血小板のGPIb α 拮抗能を有する請求項 $19 \sim 27$ のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項30】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリン、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも2つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項31】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも1つのアミノ酸と、B鎖の205番目のセリンが置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項32】

B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、グリシン、およびシステインのいずれかである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項33】

B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がグリシンである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項34】

B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がアラニンである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項35】

B鎖の203番目のグリシンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、およびセリンのいずれかである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項36】

B鎖の99番目のアスパラギン酸を置換するアミノ酸が、アスパラギンである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項37】

B鎖の43番目のヒスチジンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはアスパラギンである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項38】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、少なくともB鎖の203番目のグリシンとB鎖の205番目のセリン置換されたトロンビンであって、該205番目のセリンがグリシンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項39】

B鎖の203番目のグリシンがアラニンに置換された、請求項38に記載のトロンビン誘導体。

【請求項40】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリン及びB鎖の43番目のヒスチジンが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項41】

B鎖の205番目のセリンを置換する他のアミノ酸がグリシン、アラニン、スレオニン、システインのいずれかである、請求項40に記載のトロンビン誘導体。

【請求項42】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリンがアラニンに置換され、B鎖の43番目のヒスチジンがアラニンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項43】

さらに、ナトリウム結合部位のアミノ酸が置換された、請求項30~42のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項44】

ナトリウム結合部位のアミノ酸がB鎖の232番目又は234番目のアスパラギン酸である請求項43に記載のトロンビン誘導体。

【請求項45】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、ヒルジンC末端ペプチド結合能が野生型トロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項46】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である請

求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項47】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項48】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項49】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれか又は両方を保持し、且つトロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項50】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項51】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項52】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれか又は両方を保持し、且つフィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項53】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、該置換によってトロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に2倍以上に高まった請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項54】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、該置換によってトロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に2倍以上に高まった請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項55】

置換されるアミノ酸がB鎖の77番目のリシンである請求項47~54のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項56】

B鎖の77番目のリシンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはグルタミン酸である請求項55に記載のトロンビン誘導体。

【請求項57】

置換されるアミノ酸がB鎖の24番目のグルタミンである請求項47~54のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項58】

野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、請求項30~57のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項59】

ヒト野生型トロンビンが配列番号2のアミノ酸配列を含む蛋白質である請求項58に記載のトロンビン誘導体。

【請求項60】

カルボキシル基が修飾された請求項30~59のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体

【請求項61】

アミノ酸のエステルによってカルボキシル基が修飾された請求項 6 0 記載のトロンビン誘導体。

【請求項62】

ポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された請求項60記載のトロンビン誘導体。

【請求項63】

アミノ基を有するポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された請求項 6 0 記載のトロンビン誘導体。

【請求項64】

前記ポリエチレングリコールが分子量1000以下のポリエチレングリコールである、請求項62または63記載のトロンビン誘導体。

【請求項65】

カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された請求項60に記載のトロンビン誘導体。

【請求項66】

一分子当たり少なくとも3個以上のカルボキシル基が修飾された請求項60~65のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項67】

一分子当たり25個以下のカルボキシル基が修飾された請求項60~65のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項68】

少なくともB鎖25番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾された請求項60~67 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項69】

血小板のリストセチン凝集抑制能が向上した請求項60~68のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項70】

血小板のGPIb α 拮抗能を有する請求項 $6.0 \sim 6.8$ のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項71】

請求項1~29のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体をコードするDNA。

【請求項72】

請求項30~59のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体をコードするDNA。

【請求項73】

請求項1~70のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体を含有する医薬組成物。

【請求項74】

抗血栓剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項75】

抗炎症剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項76】

血小板凝集抑制剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項77】

血小板粘着抑制剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項78】

内因系血液凝固抑制剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項79】

トロンビンレセプター活性化抑制剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項80】

抗血液凝固作用と抗血小板作用の両方を有する請求項73に記載の医薬組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】トロンビン誘導体、およびそれを含有する医薬組成物

【技術分野】

 $[0\ 0\ 0\ 1\]$

本発明は、トロンビン誘導体、およびそれを含有する医薬組成物、特に抗血栓剤、抗炎 症剤に関する。

【背景技術】

[00002]

トロンビンは血小板凝集反応や炎症反応などを担う、トリプシンと非常に相同性の高いトリプシン様のセリンプロテアーゼである。例えば、非特許文献1には、トロンビンが、基質であるトロンビンレセプターを活性化することによって血小板凝集反応、血管内皮細胞活性化、炎症反応を起こすことが記載されている。

[0003]

 $[0\ 0\ 0\ 4\]$

これらをもとに、抗血栓剤等の開発のために、様々なトロンビンの修飾・改変が試みられている。特許文献 1 には、セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって、該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質(以下「反応抑制物質」と言うことがある)を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤が開示されている。さらに該文献には、このセリンプロテアーゼ抑制剤は、抗血栓剤(血栓形成抑制剤)として有効であることが記載されている。該文献には、該反応抑制物質の具体例として、セリンプロテアーゼであるトロンビンと、フェニルメチルスルフォニルフルオリド(以下「PMSF」と言うことがある)などの阻害剤とを反応させ、活性部位に存在するセリンをデヒドロアラニンに転換すること(以下「アンヒドロ化」と言うことがある)により、セリンプロテアーゼ活性が著しく低下したトロンビン誘導体(以下「AHT」と言うことがある)が開示されている。

 $[0\ 0\ 0\ 5]$

また、特許文献2には、アンヒドロトロンビンのカルボキシル基とイミドとを反応させ、アンヒドロトロンビンを化学的に修飾したアンヒドロトロンビン誘導体(以下「MーAHT」と言うことがある)が開示されている。MーAHTは、血液中に大量に存在するフィブリノゲンへの結合能が選択的に低いことから、AHTに較べて部分活性化トロンボプラスチン時間(APTT)延長効果が飛躍的に増加し高い抗血栓効果を有する。

 $[0\ 0\ 0\ 6\]$

一方で、アミノ酸置換を有するトロンビン誘導体の研究も行われている。トロンビンの 遺伝子組み換えによる活性中心の置換体はこれまで下記のように幾つかの検討がなされて きた。

 $[0\ 0\ 0\ 7\]$

例えば、非特許文献 5 には活性中心セリンをアラニンに置換したトロンビンを作製し白血球への影響が述べられている。この誘導体の活性に関しては活性を失ったトロンビン組

み換え体と記載されている。また、非特許文献6には、トロンビンB鎖 203 グリシンをアラニンに置換したトロンビン、活性中心セリンをアラニン又はスレオニンに置換したトロンビン、活性中心ヒスチジンをアスバラギンに置換したトロンビン、活性中心にスチジンをアスバラギンに置換したトロンビンが記載されている。この報告では、活性中心セリンをスレオニンに置換したトロンビン、活性中心ヒスチジンをアスバラギンに置換したトロンビン、活性中心ヒスチジンをアスバラギンに置換したトロンビンは、野生型トロンビンに比較し数千から数万分の1に低下しているのに比較し、トロンビンB鎖203 グリシンをアラニンに置換したトロンビン及び活性中心セリンをアラニンに置換したトロンビン及び活性中心をアラニンに置換したトロンビン及び活性中心である。しかしながら、これら報のアミノ酸置換誘導体は報告に記載されている測定法では検出不能なレベルのごく僅かいていること、血中に多量に存在するフィブリノゲンに高い親和性を有する、などにより、抗血栓、抗炎症剤としての十分な機能を有していなかった。

[0008]

その他のトロンビン誘導体については、特許文献3、非特許文献7~9に開示されるように、遺伝子工学的にアミノ酸置換を導入することによって基質活性化能を有したまま抗血液凝固効果を持つようになったトロンビン誘導体が報告されている。これらに開示されるトロンビン誘導体はトロンボモジュリン特異性が保持または増強されており、且つフィブリノゲン分解能が著しく低下した誘導体であり、トロンボモジュリンに特異的に結合しプロテイン(を活性化する事で抗血栓性を有する誘導体である。

特許文献4には、活性中心のアミノ酸が置換され、さらにヒルジンを中和する事で抗凝 固を抑制するプロトロンビン誘導体が開示されている。

特許文献 5 , 6 には、活性中心セリンがアラニンに置換されたトロンビン、及び活性中心セリンがアラニンに、かつ活性中心アスパラギン酸がアスパラギンに置換されたトロンビンが、洗浄血小板懸濁液中においてトロンビンによるトロンビンレセプターへの刺激を抑制した事が記載されている。

しかしながら、これら報告のアミノ酸置換によって得られるトロンビン誘導体は血液中に多量に存在するフィブリノゲンと強い親和性を持つため、加えたトロンビン誘導体の殆どがフィブリノゲンに結合してしまい、抗トロンビンレセプター効果を得るために多量の投与が必要となり、血液中で抗トロンビンレセプター剤(抗血小板剤)として使用することは実質的には不可能であった。

【特許文献1】国際公開第01/03740号パンフレット

【特許文献2】国際公開第02/077031号パンフレット

【特許文献 3 】 特表平 0 9 - 5 0 9 0 4 5 号 公報

【特許文献4】特表平11-507542号公報

【特許文献5】特表平6-508742号公報

【特許文献 6 】 特開 2 0 0 3 - 1 5 9 0 8 8 号公報

【非特許文献 1 】 J. Biol. Chem. 261(1986)15928-15933

【非特許文献2】日本血栓止血学会誌 第10巻 2,3号(1999)

【非特許文献3】 Biochemical J. (2001) 354.309-313

【非特許文献4】ヴォート生化学 上巻 1996年 p331-340 東京化学 同人

【非特許文献5】Experimental cell research 219, 650-656(1995)

【非特許文献6】 Biochimica et Biophyscia Acta 1451(1999) 173-186

【非特許文献7】 J. Biol. Chem Vol. 275, 39827-39830

【非特許文献8】 J. Biol. Chem Vol. 279, 26387-26394

【非特許文献9】 J. Biol. Chem Vol. 277, 27581-27584

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

[0009]

AHTやM-AHTのように化学的手法により得られたトロンビン誘導体は、抗血栓効果や抗炎症効果を有しているが、セリンプロテアーゼ活性にばらつきがあり、AHTへ変換する際のアルカリ処理、再生処理等の多工程を必要とし、回収率も50から60%と十分ではないという改善すべき点があった。

また、M-AhTにおいても微量に存在する残存トロンビン活性が、その抗凝固能を低下させる問題点があった。

$[0\ 0\ 1\ 0]$

本発明は、基質分解活性を実質的に欠き、且つ血栓形成に重要なトロンビン基質に特異的に結合することにより、生体に投与した場合に実質的に抗血栓、抗炎症剤として使用可能なトロンビン誘導体を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

$[0\ 0\ 1\ 1]$

本発明者は前述の従来技術の問題点に鑑み鋭意研究を重ねた。その結果、トロンビンのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が、遺伝子組換操作により置換されたトロンビンであり且つ抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において実質的にトロンビン基質を分解しないレベルに活性が低下していれば、AHT同様のAPTT延長を主効果とした抗血栓症効果が得られる事を見出した。さらに本発明で測定される基質活性化能を完全に失っている誘導体であればインキュベーションに影響を受けることなく確実にAPTTが延長されること、さらに、血栓形成に重要なトロンビン基質に対しより特異的な結合能を有していれば、より確実にAHT以上の抗血栓、抗炎症効果が得られる事を見出した。

$[0\ 0\ 1\ 2]$

また、トロンビンの活性中心の置換方法についてさらなる検討を行ったところ、トロンビン誘導体において活性中心セリンの置換はアラニン、スレオニン、グリシン、システインへの置換であればエクソサイト | の構造が保持されトロンビン基質結合能が保たれることを見出した。

さらに、B鎖の205番目のセリン(活性中心セリン)、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン(活性中心ヒスチジン)、および99番目のアスパラギン酸(活性中心アスパラギン酸)から選ばれた少なくとも2つのアミノ酸を最適な組み合わせに置換することにより、エクソサイト | の構造及びトロンビン基質結合能を保持し、且つ抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において実質的なトロンビン基質分解活性を喪失した、抗血栓、抗炎症効果を持ったトロンビン誘導体が得られる事を見出した。

上記置換の中でも、例えば、活性中心セリン及び活性中心ヒスチジンの置換により、トロンビン基質認識性が変化し、(主として血液凝固VIII因子特異性が向上(フィブリノゲン特異性が低下)する)、他の活性中心のアミノ酸を置換したトロンビン誘導体に比較して、低濃度においても主に血液凝固カスケード(特に部分活性化トロンボプラスチン時間(APTT))特異的な抗血栓効果を発揮するトロンビン誘導体が得られる事を見出した。

$[0\ 0\ 1\ 3\]$

本発明者はまた、上記誘導体のナトリウム結合領域を置換あるいは修飾することによってさらにトロンビン基質分解活性を低下させることができることを見出した。

さらに、上記アミノ酸置換以外のさらなる置換によって、血中に多量に存在するフィブリノゲンに対するトロンビン誘導体の親和性を、トロンビンレセプター又は血液凝固第8因子に対し相対的に低下させることにより、トロンビン基質特異性がさらに限定され、より少ない投与量によって良好な抗血栓効果を得ることができることを見出した。

さらなるアミノ酸置換によって得られるトロンビン誘導体の中でも、高いAPTT延長効果を持つが抗血小板機能は低いタイプ、及び高いAPTT延長効果と高い抗血小効果(但しPARI 阻害効果のみ)を示すタイプ等の種々の特徴を有した誘導体が作製できることを見出した

さらに、上記アミノ酸置換に加え、トロンビン誘導体が持つ抗血栓性を損なうことなく、トロンビン誘導体のトロンボモジュリン親和性を特異的に低下させることで、生体投与されたトロンビン誘導体が血管内皮細胞上でトロンボモジュリンに結合し、本来生体内で起こるトロンビンによるトロンボモジュリン上におけるプロテイン(の活性化を抑制することを防ぐことができ、より有効な抗血栓剤として機能しうる事を見出した。

また、国際公開第02/077031号パンフレット記載のカルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンの効果が主にAPTT延長効果が主体であったのに対し、上記遺伝子組み換えによって得られた種々のトロンビン誘導体を、さらに国際公開第02/077031号パンフレット記載のカルボキシル基修飾方法を用いて一定範囲の個数の修飾を行った誘導体は、その活性中心及びその他のアミノ酸の置換、及び変異体の配列の組み合わせに依存し、APTT延長及び抗血小板効果のバランスを選択しうる様々な特徴の抗血栓効果を有する事を見出した。さらに本発明の誘導体にカルボキシル基修飾を行うことでリストセチン惹起血小板凝集(血小板膜上のGPIb α とvWF(von-Willebrand factor)との相互作用による血小板凝集で、主に血小板粘着に関与する)抑制効果を有する事を見出した。

特に本発明の種々のアミノ酸置換型トロンビン誘導体をさらにカルボキシル基修飾することにより、非常に高いAPTT延長効果を持ち 且つ強い抗血小板効果(特にPARI活性化及びリストセチン惹起血小板凝集抑制効果)を有する誘導体、中程度のAPTT延長効果を持ち且つ強い抗血小板効果を有する誘導体などが得られ、アミノ酸置換とカルボキシル基修飾の組み合わせにより種々の血栓症に適応しうる抗血液凝固効果、抗血小板効果を持ったトロンビン誘導体が作製できることを見出した。

本発明者はこれらの知見に基づいて本発明を完成させた。

$[0\ 0\ 1\ 4]$

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

- (1)野生型トロンビンのアミノ酸を1個もしくは数個置換して得られるトロンビン誘導体であって、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下であるトロンビン誘導体。
- (2)トロンビン基質結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である(1)のトロンビン誘導体。
 - (3)ヒルジンC末端ペプチド結合能を有する(1)のトロンビン誘導体。
- (4)トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である(1)の トロンビン誘導体。
- (5) ヘパリン結合能が野生型トロンビンと同程度である(1) ~ (4) の何れかのトロンビン誘導体。
- (6) 0. 1 MonNaCl を含むp H7. 4 の5 0 mMトリス塩酸中でトロンビン基質と37℃で3時間反応させたときに分解されるトロンビン基質の割合が10%以下である(1) \sim (5) の何れかのトロンビン誘導体。
 - (7)トロンビン基質が血液凝固第13因子である(6)のトロンビン誘導体。
- (8)トロンビン基質がトロンビンレセプター細胞外ドメインのペプチドである(6)のトロンビン誘導体。
 - (9)トロンビン基質がフィブリノゲンである(6)のトロンビン誘導体。
- (10)0. 1 MのNaClを含むpH7.4の50mMトリス塩酸に溶解した1mg/mlフィブリノゲン溶液に、終濃度が \emptyset .lmg/mlになるように加えて、 \Im C、3時間イン

キュベーションしたときにフィブリンクロットを形成させない(1)~(6)の何れかのトロンビン誘導体。

- (11)トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である(1) ~(10)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (12)抗血液凝固カスケード効果もしくは抗血小板効果、またはその両方を有し、さらにトロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である(1)~(10)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (13)フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である(1)~(10)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (14)抗血液凝固カスケード効果もしくは抗血小板効果、またはその両方を有し、さらにフィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である(1)~(10)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (15)トロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に2倍以上に高まった(1)~(10)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (16)トロンビンレセプターまたは血液凝固第8因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に2倍以上に高まった(1)~(10)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (17)野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、(1)~(16)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (18)ヒト野生型トロンビンが配列番号2のアミノ酸配列を含む蛋白質である(17)のトロンビン誘導体。
- (19)カルボキシル基が修飾された(1)~(18)のいずれかのトロンビン誘導体
- (20)アミノ酸のエステルによってカルボキシル基が修飾された(19)のトロンビン誘導体。
- (21)ポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された(19)のトロンビン誘導体。
- (22) アミノ基を有するポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された(19) のトロンビン誘導体。
- (23)前記ポリエチレングリコールが分子量 1000以下のポリエチレングリコールである、(21)または(22)のトロンビン誘導体。
- (24) カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された(19) のトロンビン誘導体。
- (25) 一分子当たり少なくとも3個以上のカルボキシル基が修飾された(19)~(24) のいずれかのトロンビン誘導体。
- (26) 一分子当たり25個以下のカルボキシル基が修飾された(29) ~ (24) のいずれかのトロンビン誘導体。
- (27)少なくともB鎖25番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾された(19)~(26)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (28)血小板のリストセチン凝集抑制能が向上した(19)~(27)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (29)血小板のGPIb α 拮抗能を有する(19)~(27)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (30)野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリン、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも2つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。
- (31)野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスバラギン酸から選ばれた少なくとも1つのアミノ酸と、B鎖の205番目のセリンが置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導

体。

- (32) B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、グリシン、およびシステインのいずれかである(30)または(31)のトロンビン誘導体
- (33) B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がグリシンである(30) または(31) のトロンビン誘導体。
- (34)B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がアラニンである(30)または(31)のトロンビン誘導体。
- (35) B鎖の203番目のグリシンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、およびセリンのいずれかである(30)または(31)のトロンビン誘導体。
- (36) B鎖の99番目のアスパラギン酸を置換するアミノ酸が、アスパラギンである(30) または(31) のトロンビン誘導体。
- (37)B鎖の43番目のヒスチジンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはアスパラギンである(30)または(31)のトロンビン誘導体。
- (38)野生型トロンビンのアミノ酸配列において、少なくともB鎖の203番目のグリシンとB鎖の205番目のセリン置換されたトロンビンであって、該205番目のセリンがグリシンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。
- (39) B鎖の203番目のグリシンがアラニンに置換された、(38) のトロンビン誘導体。
- (40)野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリン及びB鎖の43番目のヒスチジンが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。
- (41) B鎖の205番目のセリンを置換する他のアミノ酸がグリシン、アラニン、スレオニン、システインのいずれかである、(40)のトロンビン誘導体。
- (42)野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリンがアラニンに置換され、B鎖の43番目のヒスチジンがアラニンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。
- (43) さらに、ナトリウム結合部位のアミノ酸が置換された、(30) ~ (42) のいずれかのトロンビン誘導体。
- (44)ナトリウム結合部位のアミノ酸がB鎖の232番目又は234番目のアスバラギン酸である(43)のトロンビン誘導体。
- (45) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、ヒルジンC末端ペプチド結合能が野生型トロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (46) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (47) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (48) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (49) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれか又は両方を保持し、且つトロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。
 - (50) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミ

ノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(51) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30) ~ (44) のいずれかのトロンビン誘導体。

(52) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれか又は両方を保持し、且つフィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(53) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、該置換によってトロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に2倍以上に高まった(30)~(44))のいずれかのトロンビン誘導体。

(54) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、該置換によってトロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に2倍以上に高まった(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(55) 置換されるアミノ酸がB鎖の77番目のリシンである(47) \sim (54) のいずれかのトロンビン誘導体。

(56) B鎖の77番目のリシンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはグルタミン酸である(55)のトロンビン誘導体。

(57) 置換されるアミノ酸がB鎖の24番目のグルタミンである(47) ~ (54) のいずれかのトロンビン誘導体。

(58)野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、(30)~(57)のいずれかのトロンビン誘導体。

(59)ヒト野生型トロンビンが配列番号2のアミノ酸配列を含む蛋白質である(58)のトロンビン誘導体。

(60)カルボキシル基が修飾された(30)~(59)のいずれかのトロンビン誘導体。

(61)アミノ酸のエステルによってカルボキシル基が修飾された(60)のトロンビン誘導体。

(62)ポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された(60)のトロンビン誘導体。

(63) アミノ基を有するポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された(60) のトロンビン誘導体。

(64)前記ポリエチレングリコールが分子量1000以下のポリエチレングリコールである、(62)または(63)のトロンビン誘導体。

(65)カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された(60)のトロンビン誘導体。

(66)一分子当たり少なくとも3個以上のカルボキシル基が修飾された請求項60~ 65のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

(67) 一分子当たり25個以下のカルボキシル基が修飾された請求項60~65のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

(68) 少なくともB鎖25番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾された(60) \sim (67) のいずれかのトロンビン誘導体。

(69)血小板のリストセチン凝集抑制能が向上した(60)~(68)のいずれかのトロンビン誘導体。

(70)血小板の $GP \mid \mathbf{b} \ \alpha$ 拮抗能を有する(60) \sim (68)のいずれかのトロンビン誘導体。

(71)(1)~(29)のいずれかのトロンビン誘導体をコードするDNA。

- $(72)(30)\sim(59)$ のいずれかのトロンビン誘導体をコードするDNA。
- (73)(1)~(70)のいずれかのトロンビン誘導体を含有する医薬組成物。
- (74)抗血栓剤である(73)の医薬組成物。
- (75)抗炎症剤である(73)の医薬組成物。
- (76)血小板凝集抑制剤である(73)の医薬組成物。
- (77) 血小板粘着抑制剤である(73) の医薬組成物。
- (78)内因系血液凝固抑制剤である(73)の医薬組成物。
- (79)トロンビンレセプター活性化抑制剤である(73)の医薬組成物。
- (80)抗血液凝固作用と抗血小板作用の両方を有する(73)の医薬組成物。

【発明の効果】

[0015]

本発明のトロンビン誘導体は、従来の化学的手法により得られたトロンビン誘導体に比べて、より少ない使用量で安定な抗血栓効果を得ることが出来る。なぜならば、従来のAHTやM-AHTのように化学的手法により得られたものに比べ、得られるトロンビン誘導体個々のトロンビン基質分解活性やトロンビン基質結合能のばらつきが実質的に皆無であるからである。さらに、本発明のトロンビン誘導体は、AHTやM-AHTのようにトロンビンからアンヒドロ化、再生処理の多工程を経ずに高回収率で抗血栓、抗炎症作用をもった不活性化トロンビンを得ることができる。また、従来の変異体に比べても、トロンビン基質分解活性が低いため、より少ない使用量で安定な抗血栓効果を得ることが出来る。

また、活性中心及びその他のアミノ酸の置換を行うことにより、血中に多量に存在するトロンビン基質であるフィブリノゲンへの親和性を特異的に低下させることで、より低濃度で高い抗血栓効果を得ることができる。さらにアミノ酸の置換によりトロンボモジュリンとの親和性を特異的に低下させた誘導体は、生体内でのプロテイン(活性化を阻害する事が抑制し、生体内においてAhTやM-AhTと比較しより高い抗血栓効果を有する。

また、本発明のアミノ酸の置換を行ったトロンビン誘導体と国際公開第02/0770 31号バンフレットのカルボキシル基修飾の組み合わせによって、該文献記載のカルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンとは異なる種々の特徴を持った各種血栓症に最適に適応した抗血栓効果を持ったトロンビン誘導体を得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

$[0\ 0\ 1\ 6]$

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のトロンビン誘導体は、野生型トロンビンのアミノ酸を1個もしくは数個置換して得られるトロンビン誘導体であって、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの活性よりも低下した誘導体である。ここで数個とは、2~20個、好ましくは2~10個、より好ましくは2~5個を意味する。なお、本発明のトロンビン誘導体は、トロンビン基質への結合能を保持していることが好ましい。

$[0\ 0\ 1\ 7]$

ここで野生型トロンビンとしてはヒトの野生型トロンビンが好ましく、配列番号2のアミノ酸配列を含むトロンビンがより好ましい。この配列はヒト野生型トロンビンのA鎖及びB鎖を含む配列である。なお、生体内では、トロンビンは、プロトロンビン(トロンビン前駆体)がXa因子などのプロテアーゼによって切断され、A鎖(例えば配列番号2のアミノ酸番号 $1\sim4$ 9の領域)及びB鎖(例えば配列番号2のアミノ酸番号50 $\sim308の領域)が<math>S$ -S結合によって架橋された立体構造を有している(血栓・止血・線溶 中外医学社 p164-167)。したがって、本発明におけるトロンビン誘導体は、生体内で前記構造をとることができるものであれば特に制限されず、A鎖及びB鎖の両鎖を含むトロンビンだけでなく、遺伝子組換えや化学合成などで別々に作製されたA鎖とB鎖が生体内に投与され、生体内で前記のA鎖及びB鎖がS-S結合によって架橋された立体構造をとるようになったものも含む。ここで、ヒトトロンビンにおいてはA鎖N末端の13アミノ酸残基は自己分解に切り離される。よってA鎖はヒトトロンビンにおいては100円表現る

が切り離された配列でも良い。さらに、生体内で前記の立体構造をとることのできるプロトロンビンやプレトロンビンなどのトロンビン前駆体蛋白質も本発明のトロンビン誘導体に含まれる。

[0018]

本発明において、「トロンビン基質への結合能」とは、血液凝固第8因子やトロンビンレセプターなどのトロンビン基質やその一部のペプチドに対する結合能を意味する。トロンビン基質としては血液凝固第8因子及びトロンビンレセプターが血栓形成及び炎症作用の進行に非常に重要であり、実質的には血液凝固第8因子及びトロンビンレセプターのトロンビンによる活性化を抑制することで血栓形成及び炎症作用は充分抑制される。したがって、トロンビン基質としては血液凝固第8因子あるいはトロンビンレセプターのトロンビン結合領域を含むペプチドが好ましい。

本発明において、抗血栓作用とは、好ましくは、抗血小板、抗血液凝固の1次止血、2次止血を合わせた全体での抗血栓作用を意味する。本発明の抗血小板作用、及び抗血液凝固作用を有するトロンビン誘導体は、例えば、1次止血においては主にGP1b α (血小板受容体糖タンパク質1b α)及びトロンビンレセプターに作用することで血小板へのカルボキシル基修飾トロンビン、リストセチン及びずり応力等の刺激を抑制して血小板凝集及び粘着を抑制し、2次止血においては主に血液凝固第8因子の活性化を抑制してAPTT(部分活性化トロンボプラスチン時間)を特異的に延長する。

本発明では、抗血小板効果確認の中でカルボキシル基修飾トロンビン惹起血小板凝集抑制 効果を用いて評価している。

カルボキシル基修飾トロンビンがPRP(多血小板血漿:platelet rich plasma)中において血小板凝集を惹起すること、及びその血小板凝集惹起は抗PARI抗体(ATAP2 コスモバイオ社)によって完全に阻害されることから、カルボキシル基修飾トロンビンはPARIを介して血小板を活性化すると考えられる。したがって、本発明で得られる誘導体のカルボキシル基修飾トロンビン惹起血小板凝集を阻害する効果はPARI活性化阻害効果に基づくと考えられる。

$[0\ 0\ 1\ 9]$

また、「トロンビン基質への結合能」は、トロンビン基質に保存されている領域のアミ ノ酸配列を有するペプチド、又はトロンビン基質結合に重要と報告されているサイトに特 異的に結合するペプチド、具体的には、ヒルジン(末端ペプチドなどに対する結合量を測 定することによってスクリーニングしてもよい。トロンビンのエクソサイト]は多くの血 栓形成、炎症作用を持ったトロンビン基質蛋白質への結合に最も重要な役割を果たす必須 の領域として報告されている領域であるが(Journal of Biological Chemistry 1989Vol 264 8692-8698) 、ヒルジン(末端ペプチドはこのエクソサイト | に対し特異的に結合する ことが知られる(Journal of Biological Chemistry 1991 Vol 266 23633-23636)。特に 、血小板活性化を通じて血栓形成に重要な働きを持つトロンビンレセプターはヒルジン(末端領域に高い相同性を持ち、エクソサイト|へ強固に結合する事が報告されている。よ ってヒルジン〔末端ペプチドに対する結合能を失っているものはエクソサイト]の構造が破 壊されトロンビンレセプターをはじめとする多くのトロンビン基質への結合能を失ってい るものと考えられる。ヒルジン(末端ペプチド(例えば、配列番号3)に対する結合能は 、実施例に示すようにヒルジンカラムへのトロンビン誘導体の結合量を測定することによ って行うことができる。本発明のトロンビン誘導体は、野生型トロンビン又はアンヒドロ トロンビンの1%以上、好ましくは10%以上、より好ましくは80%以上のトロンビン 基質結合能を保持していることが望ましい。ここで、アンヒドロトロンビンはトロンビン の活性中心セリンが脱水酸化されたトロンビンであって、具体的には、国際公開第 0 1/ 03740号バンフレットの実施例1記載のアンヒドロトロンビンを例示することができ る。

[0020]

一方、本発明のトロンビン誘導体は、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの活性よりも低下していることが好ましいが、この「トロンビン基質分解活性」は、フィブリ

ノゲン、血液凝固第13因子、トロンビンレセプターなどの生体基質やS2238(シグマ社より入手可)などの合成基質を用いて測定することができる。ただしトロンビン誘導体を化学修飾などにより本来トロンビンの持つ基質特異性を変化させている場合、トロンビン誘導体が特異性を残している基質を選択する必要がある。但しトロンビン誘導体と蛋白質基質のKmより明らかに基質が高濃度で測定される場合には活性測定に基質特異性は影響は無いと考えられる。また、フィブリノゲン凝固活性を確認することによっても「トロンビン基質分解活性」を測定することが出来る。

[0021]

本発明のトロンビン誘導体の活性は、野生型トロンビンに比べてより一層低下したレベルである事が望ましい。具体的には100万分の1以下、さらに望ましくは1000万分の1以下に低下していることが望ましい。トロンビンの生理的条件下における蛋白質基質活性化におけるkcat値は約 $100sec^{-1}$ レベルにもなり、他多くの基質に対しても同等のkcat値を示す。ラット投与実験におけるアンヒドロトロンビン生体内薬効半減期は1時間以内であり、ヒトにおいても同等以上が予測され、1000万分の1以下であれば抗血栓、抗炎症効果を目的としてトロンビン誘導体を投与した際、数時間にわたって蛋白性のトロンビン基質と結合した場合にもトロンビン誘導体のトロンビン基質分解活性が問題となることがないと考えられる。

[0022]

ただし、実際には合成基質による活性測定は種々のプロテアーゼの影響を大きく受け、 100万分の1のレベルの活性を正確に測定する事は難しく、正確な基質分解活性は、より好ましくはトロンビンの蛋白質基質に対する分解活性を測定した方がより微妙な分解活性を確認する事ができる。

より具体的には、本発明のトロンビン誘導体は、例えば、実施例で示すような生理的条件下、3時間、フィブリノゲン、血液凝固第13因子、トロンビンレセプター、プロテイン C などのトロンビン基質と混合し反応させた場合の該基質の分解が10%以下のものを挙げることができる。上記条件であれば生体への投与後、本誘導体が代謝されるまでの間の本誘導体によるトロンビン基質活性化は問題にならないと考えられる。なお、この活性測定方法を用いると、Biochimica et Biophyscia Acta 1451(1999) 173-186において完全に活性を失っていると報告されているB 鎖 203 番目 グリシンをアラニンに置換した誘導体は基質蛋白質分解活性を明らかに有する等、本発明記載の抗血栓剤として用いるのに必要なレベルの活性低下のスクリーニングが可能となる。

本発明で得られるトロンビン誘導体は特表平09-509045、J. Biol. Chem Vol. 275, 39827-39830, J. Biol. Chem Vol. 279, 26387-26394、J. Biol. Chem Vol. 277, 27581-27584, に開示されるトロンビン誘導体とは異なる抗血栓作用の機構を有する。

すなわち、これらの文献に開示されるトロンビン誘導体はトロンボモジュリン特異性が保持又は向上しており、優先的にプロテイン(を活性化する事で抗血栓性を発揮する。これに対し、本発明のトロンビン誘導体はプロテイン(を含むトロンビン基質の活性化能を有さない。また反対にトロンボモジュリン親和性もより低下している事が望ましい。本発明のトロンビン誘導体は、より特異的に、血栓形成に重要なトロンビン基質に対し、活性化すること無しに結合し、血液中に存在するトロンビンによるこれらトロンビン基質の活性化を抑制することによって抗血栓性を発揮する。反対に本発明のトロンビン誘導体は生体内のトロンビンのトロンボモジュリン結合を阻害しないことが望ましく、トロンボモジュリン親和性は低下している事が望ましい。

$[0\ 0\ 2\ 3\]$

本発明のトロンビン誘導体は、通常の遺伝子変異導入法によってトロンビンの変異体をコードするDNAを作製し、該DNAを哺乳動物細胞などで発現させることによって得られる変異体の中から基質分解活性が低下し、かつ、ヒルジン及びトロンビン基質に対する結合能を保持しているものを選択することによって第一段階のスクリーニングをすることができる。

[0024]

本発明の1個又は数個のアミノ酸を置換して得られるトロンビン誘導体は、抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において、実質的にトロンビン基質分解活性を喪失しており、且の基質結合能を野生型トロンビンと同等に保持していれば特に制限されるものではないが、具体的には、B鎖の205番目のセリン(B鎖205;配列番号2の254番目のセリン(B鎖205;配列番号2の252番目のセリンに相当するセリン)、43番目のヒスチジン(B鎖43;配列番号2の92番目のアスチジンに相当するピスチジン)、43番目のアスがラギン酸(B鎖43;配列番号2の92番目のアスチジンに相当するアスがラギン酸に相当するアスがラギン酸(B鎖99;配列番号2の148番目のアスがラギン酸に相当するアスがラギン酸はれた2つ配列番号2の148番目のアスがラギン酸に相当するアスがラギン酸が高選はれた2つのグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスがラギン酸から選ばれた1つ以上のアミノ酸と、B鎖の205番目のグリシン、43番目のヒスチジンのいずに必要であることが好ましく、B鎖の205番目のセリンが置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体が特に好ましい。

[0025]

活性中心であるB鎖205番目のセリンは、その置換によってエクソサイト | の構造が破壊されてトロンビン基質結合能が損なわないようにするために、スレオニン、アラニン、グリシン、システインのいずれかに置換されていることが好ましく、アラニン、グリシンへの置換がより好ましい。B鎖203グリシンは、アラニン、セリン、スレオニンのいずれかに置換されている事が好ましい。B鎖99のアスバラギン酸は、アスバラギンに置換されていることが好ましい。B鎖43のヒスチジンは、アラニンまたはセリンまたはアスバラギンに置換されていることが好ましい。

[0026]

なお、本明細書中において、B鎖205、B鎖203等は、B鎖の1番目のアミノ酸(例えば、配列番号2のアミノ酸番号50のイソロイシン)から数えたアミノ酸番号を示している。なお、上記のような置換アミノ酸の位置はアミノ酸の欠失、挿入、付加などによって位置が前後することがある。例えば、N末端部に1つのアミノ酸残基が挿入されれば本来205番目のセリン残基は206番目となるが、そのような205番目のセリン残基に相当するセリン残基も、本発明においては205番目のセリン残基と呼ぶこととする。

[0027]

以下にアミノ酸の置換とそれによって得られる誘導体について説明する。 本発明のトロンビン誘導体は1)のステップ及び2)、3)の付加的ステップによって得られる。

- 1)活性中心のアミノ酸の置換によって活性を喪失させ、且つ、エクソサイト | 及び | 1等 の重要部位の構造が保存された配列を選択し、好ましくはその中でも抗血栓効果の高い活性中心のアミノ酸置換の組み合わせを選択するステップ、
- 2)活性中心以外のアミノ酸の置換によって1)で得られた基本となる誘導体の基質特異性を変化させ、1)の誘導体より高い抗血栓効果、トロンボモジュリンへの親和性の特異的な低下 等の特徴を付加させるステップ、
- 3) 1) または2) のトロンビン誘導体のカルボキシル基を修飾することで、さらに高い抗血栓作用を有する誘導体、抗血栓作用の中でも内因系凝固、トロンビンレセプターの活性化による血小板凝集、リストセチン惹起血小板凝集(血小板粘着)に対し種々の強さで抑制しうる誘導体を作製するステップ。

以下、アミノ酸の置換の影響、意味合いを理解しやすくする為、活性中心のアミノ酸の 置換、活性中心以外のアミノ酸の置換に分けて説明する。

[0028]

活性中心アミノ酸の置換について

B鎖の205番目のセリン、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸のうち、置換される2つ以上のアミノ酸の組合せは特に制限されるものではないが、置換を受ける2つ以上のアミノ酸(置換部位)の組合せ、さらには、

置換相手となるアミノ酸の種類により、基質結合能や抗血栓効果に違いが出ることがある。一例として、下記トロンビン誘導体1~5を挙げて説明する。

[0029]

トロンビン誘導体1:置換部位がB鎖205番目のセリンと99番目のアスパラギン酸であり、セリンをアラニンに置換し、アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン誘導体(配列番号22のアミノ酸番号44~351の配列)。

トロンビン誘導体2:置換部位がB鎖205番目のセリンと43番目のヒスチジンであり、セリンをアラニンに置換し、ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン誘導体(配列番号26のアミノ酸番号44~351の配列)。

トロンビン誘導体3:置換部位がB鎖205番目のセリンと203番目のグリシンであり、セリンをグリシンに置換し、グリシンをアラニンに置換したトロンビン誘導体(配列番号8のアミノ酸番号44~351の配列)。

トロンビン誘導体4: 置換部位がB鎖205番目のセリンと203番目のグリシンであり、セリンおよびグリシンをアラニンに置換したトロンビン誘導体(配列番号24のアミノ酸番号44~351の配列)。

トロンビン誘導体5:置換部位がB鎖205番目のセリン、203番目のグリシン、および99番目のアスパラギン酸であり、セリンおよびグリシンをアラニンに置換し、アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン誘導体(配列番号14のアミノ酸番号44~351の配列)。

トロンビン誘導体6:置換部位がB鎖205番目のセリン、43番目のヒスチジンであり、セリンをグリシンに置換し、ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン誘導体(配列番号34のアミノ酸番号44~351の配列)。

トロンビン誘導体7:置換部位がB鎖205番目のセリン、43番目のヒスチジンであり、セリンをアラニンに置換し、ヒスチジンをセリンに置換したトロンビン誘導体(配列番号36のアミノ酸番号44~351の配列)。

[0030]

トロンビン誘導体1~5は何れも、ヒルジンゲルへの結合能を保持していたが、トロンビン誘導体4および5は、野生型トロンビンに比べ、ヘバリンゲルへの結合能が低下していた。

[0031]

トロンビン誘導体 1 ~ 5 は何れもAPTT延長を主とした抗血栓効果を有するものであるが、その効果の序列は下記の通りであった。

「トロンビン誘導体2>トロンビン誘導体1、3>>トロンビン誘導体4、5」特に、トロンビン誘導体2は、後述のようなカルボキシル基修飾の有無に関わらず非常に高い抗血栓効果がみられた。また、トロンビン誘導体2にみられる抗血栓効果は、凝固カスケードに対し特異的に作用するものであり、特にAPTTを良く延長した。さらに、トロンビン誘導体2のカルボキシル基を修飾したトロンビン誘導体における抗血栓効果は、いずれも強い、凝固カスケード、血小板凝集、および血小板粘着抑制作用によってもたらされるものであった。

トロンビン誘導体2および4は、共に205番目のセリンをアラニンに置換したものであるが、前述のようにその抗血栓効果には大きな違いが見られた。トロンビン誘導体3および4も、共に203番目のグリシンをアラニンに置換したものであるが、やはりその抗血栓作用には前述のような違いが見られた。

トロンビン誘導体1,3はそのままではそれほど強い抗血栓性は有さないが、後述のような化学修飾によって基質特異性を変化させるか、又はアミノ酸(例えばB鎖77番目のリシン)を置換しフィブリノゲンへの親和性を特異的に低下させ、相対的に血液凝固第8因子に対する特異性を向上させる事によって、強いAPTT延長抑制効果又は血小板凝集抑制効果の一方又は両方を有するトロンビン誘導体が得られる。具体的には、化学修飾の場合はAPTT延長と抗血小板効果(凝集と粘着)が得られ、77番目のアミノ酸置換の場合はAPTT延長効果のみが得られる。

一方、トロンビン誘導体4,5においてはカルボキシル基の化学修飾を行った場合でも、また77番目のリシンを置換し遺伝子工学的に特異性を変化させてもあまり強い抗血栓能は得られなかった。

誘導体6,7は誘導体2同様に近い抗血栓能を示した。

$[0\ 0\ 3\ 2]$

以上より、トロンビン活性中心の置換によって得られるトロンビン誘導体は、以下の様に分類される。ただし、以下の分類はあくまでも一例であり、本発明のトロンビン誘導体はこの外の分類に分類されるトロンビン誘導体であってもよい。

- A) 活性中心セリン及び活性中心ヒスチジンを同時に置換することによって得られる、カルボキシル基修飾及びフィブリノゲンへの親和性を低下させる分子表面のアミノ酸の置換無しで強いAPTT延長効果を主とした抗血栓能を有するタイプ。
- B)活性中心セリン及び活性に関与する他のアミノ酸1つを同時に置換することによって得られるトロンビン誘導体であり、そのままではそれほど強い抗血栓能を持たないが、カルボキシル基修飾及び/又はフィブリノゲン親和性を低下させるさらなるアミノ酸の置換によって高い抗血栓能が現われるタイプ。
- () 活性中心セリンのみ/又は活性に関与する他のアミノ酸1つを同時に置換することによって得られるトロンビン誘導体でありカルボキシル基修飾及び/又はフィブリノゲン親和性を低下させるアミノ酸の置換によっても高い抗血栓能は現われないタイプ。
- D) 抗血栓能を有しているものも残存活性を有しているため、抗血栓剤としては使用できないタイプ。
- A)のグループに関してフィブリノゲン、血液凝固第8因子(FVIII)に対する基質特異性を確認したところ、活性中心のセリン、ヒスチジンを置換したグループはいずれも血液凝固第8因子特異性が向上していることが分かった。よって高いAPTT延長効果は活性中心のアミノ酸の置換の組み合わせによって基質分解活性が喪失されるとともに血液凝固第8因子特異性が向上(フィブリノゲン特異性が低下)したことに起因すると考えられる。本グループの誘導体は化学修飾無しに、そのフィブリノゲン親和性の低下により弱い抗血小板効果も確認された。また、その効果はPARI活性化抑制効果であり、リストセチン惹起血小板凝集抑制効果は有さない特徴を有していた。

[0033]

トロンビンの立体構造を勘案すると活性中心と、ヒルジン(末端ペプチド、ヘバリンのそれぞれの結合部位であるエクソサイト|及び||は立体構造上距離が離れている。即ち、上記で例示された活性中心の置換の組み合わせにより、ヘバリン親和性が低下したグループ及び実施例で記載されている活性中心のアミノ酸の置換によってヒルジン(末端ペプチドゲルへの親和性が低下した誘導体は、活性中心のアミノ酸の無理な(構造上負荷のかかる)置換によって分子全体のフォールディング異常、構造に異常が起こったと考えられる。その為、基質親和性の低下が起こり抗血栓能の低下が起こったと推測される。

[0034]

上記記載の活性中心の置換で基質親和性を有し抗血栓能を有した配列(構造の正常な配列)に対しさらに抗血栓能を向上させる目的でエクソサイト | 及び | | 領域上のアミノ酸のさらなる置換を組み合わせた誘導体の説明を以下に行う。このさらなるアミノ酸の置換によってヘバリン、ヒルジンゲルへの親和性が低下する場合も存在するが、これは結合領域への直接的なアミノ酸の変異の結果であり、活性中心のアミノ酸の置換での蛋白全体の構造異常に基づく親和性の低下とは異なるものである。

[0035]

活性中心以外のアミノ酸の置換を述べる。

本発明のトロンビン誘導体は、上記置換に加えて、活性中心に関与するアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸のさらなる置換によってトロンボモジュリン及び/またはフィブリノゲンへの結合能を特異的に低下した誘導体であることが好ましい。ここで、活性中心のアミノ酸としては、B鎖の205番目のセリン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸などが挙げられる。このような誘導体のトロンボモ

ジュリン及び/またはフィブリノゲン結合能は野生型トロンビンの50%以下に低下していることが好ましい。トロンボモジュリン結合能を選択的に低下させることで、本発明のトロンビン誘導体が生体内に投与された場合にトロンボモジュリンに結合し、本来生体内で機能するべきトロンビンのプロテイン(活性化を抑制することを防ぐことができる。このようなトロンビン誘導体は、少なくとも抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれかを保持するものが好ましい。

トロンビンは、生体内ではトロンビンレセプター、血液凝固第8因子、トロンボモジュリン及びフィブリノゲンなどへの結合能を有しているが、上記トロンビン誘導体は、トロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に高まる事で抗血栓効果が有意に高まったトロンビン誘導体、またはトロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に高まったトロンビン誘導体であることが好ましい。なお、「相対的に高まった」とは、例えば、アミノ酸の置換により、置換前に比較し、誘導体の、トロンビンレセプター又は血液凝固第8因子に対する結合定数、又はIAsys等での結合容量と、トロンボモジュリンやフィブリノゲンに対する結合定数もしくは結合量の比が高まったことをいう。

[0036]

トロンボモジュリン及び/またはフィブリノゲンへの結合能を特異的に低下させる置換は特に限定されるものではないが、B鎖77番目のリシン(B鎖77;配列番号2の126番目のリシンに相当するリシン)又はB鎖24番目のグルタミン(B鎖24;配列番号2の73番目のグルタミン)、B鎖65番目のリシン(配列番号2の114番目のリシンに相当するリシン)等があげられる。B鎖77リシン及びB鎖24グルタミン、B鎖65リシンを置換するアミノ酸は特に限定されるものではないが、アラニン、セリン、スレオニン、グルタミン酸またはグルタミンであることが好ましい。

以下に例をあげると、活性中心 203 グリシンをアラニンに活性中心 205 セリンを グリシンに置換したトロンビンは殆どAPTT延長効果を示さなかった。しかしながら、さらに本誘導体にB鎖 77 リシンの グルタミン酸への置換を組み合わせた誘導体(配列番号 28 のアミノ酸番号 44 ~ 351 の配列)は、血液凝固第 8 因子特異性がフィブリノゲン特異性に対し相対的に向上し且つ高いAPTT延長効果を有した。

また、活性中心セリンをアラニンに、かつ活性中心ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビンは高いAPTT延長効果を示した。この誘導体にさらに、B鎖77リシンのグルタミン酸又はアラニンへの置換を導入することでさらに、さらに強いAPTT延長抑制効果を有した(配列番号38または44のアミノ酸番号44~351の配列)。すなわち活性中心の置換による特異性の変化とさらに分子表面のアミノ酸置換による特異性の変化が相乗効果となって薬効の強さに影響する事がわかる。

また、活性中心セリンをアラニンに、かつヒスチジンをアラニンに置換し、さらにB鎖 24 番目のグルタミンをグルタミン酸に置換した誘導体(配列番号 40 のアミノ酸番号 $4\sim351$ の配列)は、APTT延長効果を有し且つ、TM(トロンボモジュリン)結合能が著しく低下していた。

活性中心セリンをアラニンに、かつヒスチジンをアラニンに置換し、さらにB鎖65番目のリシンをアラニンに置換した誘導体(配列番号46のアミノ酸番号44~351の配列)は、APTT延長効果が増幅し、更にトロンボモジュリン親和性が低下するという2重の効果がみられた。

このように活性中心のアミノ酸の置換に加えてトロンビン分子表面の各蛋白質への相互作用部位を置換することで種々の特徴を有したトロンビン誘導体が得られる。

本発明で得られるトロンビン誘導体はプロトロンビン体にて生体内に投与されることも可能である。その場合、血栓部位にて抗血栓効果を持ったトロンビンに活性化を受け、血栓形成箇所にて抗血栓効果を発揮し、生体内にてより部位特異的な抗血栓効果が得られる。

[0037]

本発明のトロンビン誘導体は、上記置換に加えて、さらに、ナトリウム結合部位が置換されたトロンビン誘導体であってもよい。ナトリウム結合部位とはBiochemistry 1992年,

31巻,p11721-11730に開示された部位をいう。この中ではB鎖232又はB鎖234のアスパラギン酸(配列番号2の281又は283番目のアスパラギン酸に相当するアスパラギン酸)が好ましい。これらのアスパラギン酸は両方が置換されてもよい。また、これらのアスパラギン酸は、アラニンもしくはアスパラギンに置換されることが好ましい。

[0038]

本発明のトロンビン誘導体は、ヒルジンC末端ペプチドへの結合能が野生型トロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である限りにおいて、上述した置換されるアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加されたアミノ酸配列を有する誘導体であってもよい。なお、ここで数個とは、2~20個、好ましくは2~10個、より好ましくは2~5個を意味する。また、ヒルジンC末端ペプチドへの結合能が野生型トロンビンの1%以上、かつトロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である限りにおいて、配列番号2のアミノ酸配列と全体として一定以上の相同性、すなわち、80%以上、好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を有する範囲で改変されたものであってもよい。

[0039]

上記のようなトロンビン誘導体は部位特異的変異導入法により各誘導体をコードするDNAを作製し、該DNAを哺乳動物細胞などで発現させることによって得られる。このようなDNAは上述したようにA鎖及びB鎖の両方をコードするものであってもよいし、各鎖をそれぞれ発現させてもよい。部位特異的変異導入法は特に限定されるものではないが、例えば、市販のQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (ストラタジーン社製)などを用いて行っても良い。また、化学合成によってトロンビン誘導体を得ることもできる。

[0040]

本発明のトロンビンはさらに、上記の誘導体のカルボキシル基が修飾されたものであってもよい。この場合、カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾されたものが好ましい。カルボキシル基が修飾されることによって、フィブリノゲンに対する結合能が低下するため、トロンビンレセプターなどの基質に対する選択性が増し、より少量で抗血栓効果を達成することができる。

さらに上記カルボキシル基修飾によりリストセチン惹起血小板凝集(GPIb α と v WFの相互作用による)を抑制する効果が加わる。

トロンビン誘導体のカルボキシル基の修飾は、例えば、国際公開02/077031号バンフレットに記載の方法に基いて行うことができる。

$[0\ 0\ 4\ 1]$

また、上記誘導体をアミノ基を有する化合物を用いてカルボキシル基修飾してもよい。アミノ基を有する化合物は特に制限されないが、アミノ酸のエステル、側鎖にアミノ基を有するポリエチレングリコールなどが好ましい。アミノ酸のエステルとしてはグリシンエチルエステルなどが挙げられる。アミノ基を有する化合物を用いる修飾も国際公開 0 2 / 0 7 7 0 3 1 号パンフレットに記載の方法に基いて行うことができる。一方、上記誘導体をポリエチレングリコールと反応させることによって、カルボキシル基を修飾してもよい。なお、ポリエチレングリコールまたはアミノ基を有するポリエチレングリコールを用いる場合、ポリエチレングリコール部分の分子量は 1 0 0 0 以下であることが好ましい。

[0042]

抗血栓効果を特異的に上げるためにトロンビン表面のアミノ酸の置換を行った場合に得られる効果、及びさらにカルボキシル基修飾を組合わせた場合に得られる効果は、置換するアミノ酸の組み合わせなどによって大きく異なり、疾患及び病態などに応じて、また目的に応じてアミノ酸置換のみを導入したトロンビン誘導体または化学修飾を組み合わせたトロンビン誘導体を用いることができる。

即ち、深部静脈血栓症等の静脈における血栓症においては血液凝固を抑制する薬が一般に用いられるため、各トロンビン誘導体及びそのカルボキシル基修飾体の中から高いAPTT 延長効果を持つトロンビン誘導体を用いることが望ましい。

一方、心筋梗塞、不安定狭心症等の動脈系の血栓症においては血小板凝集を抑制する薬が一般に用いられるため、高い血小板凝集抑制効果を持ったトロンビン誘導体が望まれる。その中よりAPTT延長効果の異なるトロンビン誘導体は出血など副作用の状況等に応じて選択がなされるべきである。

また、動脈硬化部位におけるプラークの破錠にともなう、血栓症においては血小板と共に凝固系の抑制も重要であることが報告されており(血栓症、南江堂)血小板、凝固双方の抑制が効果的である。このような凝固、血小板両方に作用する薬剤は現在市販されておらず、本発明により全く新たな治療剤を提供しうる。

[0043]

以下にトロンビン誘導体の活性中心のアミノ酸置換とそのカルボキシル基修飾との関係について一例を挙げて説明する。以下の説明は水溶性カルボジイミドを縮合剤として用い、且つ修飾をグリシンエチルエステルによって行い約15個のカルボキシル基が修飾された誘導体である。

修飾体1:B鎖205セリンをアラニンに、かつB鎖43ヒスチジンをアラニンに置換した誘導体は、カルボキシル基の修飾を行わずとも、非常に高いAPTT延長効果を有している。本配列のトロンビン誘導体はカルボキシル基修飾を行った場合APTT延長効果の増幅もある程度之られるが、それ以上にカルボキシル基修飾を行った本配列のトロンビン誘導体は血小板に対するリストセチン凝集抑制効果、カルボキシル基修飾トロンビン(Mートロンビン)凝集抑制効果が大きく高まり、結果、抗血液凝固、抗血小板能共に非常に高い効果をもった誘導体が得られた。

修飾体2:B鎖205セリンをグリシンに、B鎖203番目のグリシンをアラニンに置換した誘導体は、化学修飾前には APTT延長効果、抗血小板効果は弱いものであるが、カルボキシル基修飾を行うことで、APTT延長効果、抗血栓効果が高まり中程度のAPTT抑制効果と高い抗血小板効果を持ち合わせたトロンビン誘導体が得られた。

修飾体3:B鎖205セリンをアラニンに、B鎖203番目のグリシンをアラニンに置換したトロンビン誘導体はAPTT延長効果をほとんど示さなかった。このトロンビン誘導体のカルボキシル基を修飾した場合にもAPTT延長効果の増幅は顕著には見られなかった。

修飾体4:B鎖205セリンをグリシンに、B鎖203グリシンをアラニンに、B鎖77リシンをグルタミン酸に置換したトロンビン誘導体はAPTT延長効果を持つが、抗血小板効果は非常に弱いものである。このトロンビン誘導体のカルボキシル基修飾を行った場合にはAPTT延長効果のさらなる増加は殆ど見られないが、抗血小板効果は顕著に増幅された。但し修飾による回収率は50%以下であり著しく低下した。

修飾体5:205セリンをアラニンに置換した誘導体は比較的弱いAPTT延長効果を持つが抗血小板効果は非常に弱いものであった。このトロンビン誘導体にカルボキシル基修飾を行った場合にはAPTT延長効果の大幅な増幅は見られないが、抗血小板効果は(PARI及びリストセチン両方の経路に対し)顕著に増幅された。

修飾体 6:B鎖 205 セリンをアラニンに、B鎖 43 ヒスチジンをアラニンに、B鎖 65 リシンをアラニンに置換した誘導体は強いAPTT延長効果と共に強いPAR1経路の血小板凝集抑制効果を有していた。一方、リストセチン惹起血小板凝集抑制効果は有していなかった。このトロンビン誘導体にカルボキシル基修飾を行った場合はAPTT延長効果が若干増強し、M-トロンビン惹起血小板凝集効果にはそれほど大きな違いは確認されなかったが、リストセチン惹起血小板凝集抑制効果が新たに付与された。また、修飾体 4 にみられた回収率の大きな低下はおきなかった。

$[0 \ 0 \ 4 \ 4]$

り応力惹起血小板凝集)効果が種々のバランスで組み合わさった種々の抗血栓効果を持ったタイプのトロンビン誘導体を選択することができる。

また、 $GP1b\alpha$ のみ抑制する誘導体の場合は活性中心が閉塞する事によって活性及び基質親和性が低下したPPACK-トロンビン(Phe-Pro-Arg配列がクロロメチルケトン修飾されたもの)を修飾した誘導体を用いることが出来る。但しその場合も本明細書記載のトロンボモジュリンに対し親和性を低下させる置換を分子表面に施すことによりより有効な効果を発揮する。

[0045]

本発明の各種トロンビン誘導体は、目的によって使い分ける事が可能である。例えば、トロンビン誘導体2は静脈内におけるフィブリン血栓(赤色血栓)に対し効果的である事が予測され、トロンビン誘導体2のカルボキシル基修飾体は、動脈内の血小板血栓(白色血栓)に対しても効果的である事が予想される。

あるいは化学修飾を行わない前述の活性中心セリンがアラニンに、活性中心ヒスチジンがアラニンに、かつB鎖77リシンがグルタミン酸に置換されたトロンビンも静脈内血栓に関しては有効と考えられる。

又、動脈内での血小板血栓においてもその疾患において出血が問題になる場合には、トロンビン誘導体2のカルボキシル基修飾体よりもAPTT延長効果の低いトロンビン誘導体3のカルボキシル基修飾体の方が望ましい。これらは疾患の患者に対するリスクと出血のリスクを考慮して選択することができる。

上記に記載されるヘバリン結合能の低下に関して、そのヘバリン結合能の低下がヘバリン結合領域(エクソサイト日等)以外の領域、例えば活性中心のアミノ酸の置換によって引き起こされる場合、その置換によってトロンビン変異体全体の分子構造に歪む等の悪影響が与えられ、ヘバリン結合能が低下したと推察される。

実際に生体内に投与する場合、活性中心を本発明で開示されるような最適な組み合わせで変異させた上で、目的に応じ、さらなる組換え体として積極的にエクソサイト IIに位置するアミノ酸(例えばB鎖98番目のアルギニン、B鎖245番目アルギニン、B鎖248番目リジンをアラニン等の他のアミノ酸)に置換する事によってヘバリン親和性を低下させたトロンビン誘導体を得ることも可能である。ヘバリン親和性を低下させた誘導体を用いることで血管内皮細胞上のヘバラン硫酸等への親和性が低下し血中循環量の向上が期待される。

[0046]

なお、カルボキシル基修飾を行う場合、カルボキシル基修飾によって付加される効果は その修飾個数によっても大きく影響を受ける。

トロンビンのカルボキシル基修飾による上記各誘導体が修飾体1から5に記載される所望の効果を得るためには3個以上のカルボキシル基が修飾される事が望ましい。3個以下では前記カルボキシル基修飾によって付加される効果は著しく低下する。同様にカルボキシル基修飾は25個以下であることが望ましい。25個を超えた場合にも前記カルボキシル基修飾による効果は著しく低下すると共に 修飾による回収率の著しい低下が起こる。但しトロンビン誘導体表面にアミノ酸置換によってカルボキシル基を導入、削除して得られるトロンビン誘導体に関しては、その置換によるカルボキシル基の増加、減少は除いて考える。

さらに修飾個数によって多様な効果を持った誘導体が得られる。例えば前述の修飾体1)の修飾個数を8又は5個と減らす事で非常に高いAPTT延長効果と中から低度の抗血小板効果を持った誘導体が得られる。

カルボキシル基を修飾する場合、少なくともB鎖25番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾されたものであることが好ましい。本発明のカルボキシル基が修飾されたトロンビン誘導体は、血小板のリストセチン凝集抑制能が向上された誘導体及び/または血小板のGPIbα拮抗能を有する誘導体であることが好ましい。

$[0\ 0\ 4\ 7]$

本発明はまた、上述したようなトロンビン誘導体をコードするDNAを提供する。この

ようなDNAとしては、例えば、配列番号 7、13、21、23、25、27、33、35、37 または 39 の塩基番号 130~1056 の塩基配列を含む DNA などを例示することができる。また、上述したようなトロンビン誘導体をコードする限りにおいて、配列番号 7 の塩基番号 130~1056 の塩基配列を含む DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするものであってもよい。ここで、ストリンジェントな条件としては、例えば、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である 60 $\mathbb C$ 、 $1\times SSC$ 0.1% SDS S、好ましくは $0.1\times SSC$ 0.1% SDS に相当する塩濃度で、1 回より好ましくは 2 2 3 回洗浄する条件が挙げられる。

[0048]

本発明のトロンビン誘導体は抗血栓作用を有している。この作用は、例えば、実施例に示すような血漿の部分活性化トロンボプラスチン時間(APTT)測定や全血凝固時間測定、血小板凝集能抑制効果によって確認することができる。

本発明のトロンビン誘導体を製剤学的に許容される製剤担体と組合わせることにより、医薬組成物として使用することができる。ここで、医薬組成物として好ましくは、抗血栓治療薬、抗炎症剤、血小板凝集抑制剤、血小板粘着抑制剤、血小板GPIb拮抗剤、トロンビンレセプター活性化抑制剤などを挙げることができる。上記製剤担体は製剤学的に許容されるものであれば特に制限されないが、通常の薬剤に汎用される注射剤用溶剤、安定剤、希釈剤、界面活性剤等を使用できる。本発明の医薬組成物の投与単位形態は特に限定されず、治療目的に応じて適宜選択できる。例えば、注射剤等を例示できる。本発明の医薬組成物の投与量は、症状などに応じて適宜選択される。

【実施例】

[0049]

以下実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はその趣旨を超えない限り、この実施例の範囲には限定されない。以下、血液凝固第8因子は、単にFVIIIと呼ぶこともある。また、血液凝固第13因子は、単にFXIIIと呼ぶこともある。

[0050]

<1>トロンビン基質分解活性の測定

方法A:合成基質S2238(シグマ社)を基質とし、50mMトリス塩酸(pH8)、37℃における405nmの吸光度の増加による測定を行った。

被験サンプル(ヒト野生型トロンビンまたはトロンビン誘導体)の $50\,\mathrm{mM}$ トリス塩酸 $0.1\,\mathrm{M}$ NaCl溶液(pH7.4)、ヒト野生型トロンビンの場合の濃度は $1\,\mu$ g/ml、トロンビン誘導体の場合の濃度は $200\,\mu$ g/ml)と、合成基質 $S2238050\,\mathrm{mM}$ トリス塩酸 $0.1\,\mathrm{M}$ NaCl溶液(pH7.4)を、 $200\,\mu$ l ずつエッペンチューブに加え、 $37\,\mathrm{C}$ 、12時間インキュベーションした。反応停止は $50\,\mathrm{C}$ 酢酸 $200\,\mu$ l を添加して行った。

なお、合成基質 S 2 2 3 8 の 5 0 m M トリス塩酸 0.1M NaCl 溶液(pH7.4)と、5 0 m M トリス塩酸 0.1M NaCl (pH7.4)を、2 0 0 μ l ずつエッペンチューブに加え、37 \mathbb{C} 、1 2 時間 インキュベーションしたものをコントロールとした。

12時間インキュベーションした後のコントロールの吸光度は、インキュベーション前に比べて0.005増加した。被験サンプルの12時間インキュベーション終了後の吸光度の増加が、インキュベーション前の吸光度に比べて0.05以下の場合は測定限界以下であると判定した。

方法Aにおいて活性が認められないレベルに活性が低下したトロンビンに関しては、さらに以下の方法B又はC又はDいずれかの活性測定を行った。

$[0\ 0\ 5\ 1]$

方法B:FXIIIとしてフィブロガミンP(アベンティス ファーマ)を用いた。 3 m l のフィブロガミンP 250 単位を50 m M EDTA、0.1 M NaCl(pH7.4)に透析した溶液 50μ l に対し、被験サンプル0.1 mg/ml(トロンビン誘導体)のPBS溶液(pH7.4) 100μ l をエッペンチューブに加え、37 C、 3 時間 インキュベーションした後、SDS-PAGEによってFXII lの活性化の有無を確認した。目視で分解産物が確認される場合にSDSPAGEを一SH条件下で行いFXIIIのA鎖及び活性化A鎖のバンドの濃さをライトキャプチャー(アトー株式会社)

を用い解析比較した。

[0052]

方法 $C: 50\,\text{mM}$ トリス塩酸 $0.1\,\text{M}$ Na CI (pH7.4) に溶解した $4\,\text{m}$ g/m 1 フィブリノゲン溶液 $2\,0\,0\,\mu$ 1 に、 $0.2\,\text{m}$ g/m 1 に調整された被験サンプル(トロンビン誘導体)を $1\,0\,0\,\mu$ 1 添加し良く混和したのち、 $37\,\text{C}$ 、3 時間のインキュベーションを行った。 3 時間後のクロット形成の有無を目視によって判断した。

[0053]

方法D: $50\,\text{nM}$ トリス塩酸 $0.1\,\text{M}$ NaCl pH7. 4に溶解した $0.1\,\text{mg/ml}$ トロンビンレセプター細胞外ドメインペプチド(配列番号 4)溶液 $200\,\mu$ l に、 $0.3\,\text{mg/ml}$ に調整された被験サンプル(トロンビン誘導体)を $100\,\mu$ l 添加し 良く混和したのち、 $37\,\text{C}$ 3時間のインキュベーションを行った。 $50\,\text{M}$ m酸 $200\,\mu$ l を添加して反応を停止した後、SDS-PAGEによってトロンビンレセプターの活性化の有無を確認した。目視で分解産物が確認される場合にSDSPAGEを-SH条件下で行いトロンビンレセプターの分解産物のバンドの濃さをライトキャプチャー(アトー株式会社)を用い解析比較した。

 $[0\ 0\ 5\ 4]$

< 2 > 基質結合能の測定法

方法E:ヒルジンC末端ペプチド(配列番号3)への結合性の確認

(1) ヒルジン(末端ペプチドゲルの作製

ヒルジン(末端ペプチド1 0 \mathbf{m} \mathbf{g} \mathbf{e} 0. 1 \mathbf{M} \mathbf{N} \mathbf{a} \mathbf{H} \mathbf{c} $\mathbf{0}$ \mathbf{g} $\mathbf{g$

(2) ヒルジン(末端ペプチド(配列番号3)への結合性の確認 ヒト野生型トロンビンもしくはトロンビン誘導体を含有する分画の2m1を、50mMトリス塩酸 0.15MN aCl(pH8) 4℃に平衡化したヒルジン(末端ペプチドカラム<math>10m1に添加し、30m1の50mMトリス塩酸緩衝液で洗浄後、50mMトリス塩酸1MNaCl 3M 尿素(pH8)で溶出した。抗ヒトトロンビン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより素通り分画、および溶出分画のトロンビンを確認した。なお、本実験では50%以下の担体への結合の誘導体は基質結合能を喪失していると判断した。

[0055]

方法F:バイオセンサー(IAsys日製産業)を用いたトロンビン誘導体のトロンビンレセプター結合能の測定

(1)トロンビン誘導体固定化キュベットの作製

被験サンプル(トロンビン誘導体) $10\,\mathrm{mM}$ リン酸バッファー(pH7.7)を、NHS活性化0Mデキストランキュベット(日製産業社)10分間 $25\,\mathrm{C}$ で撹拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS活性化0Mデキストランキュベットに固定し、トロンビン誘導体固定化キュベットを得た。引き続き $1\,\mathrm{M}$ エタノールアミン(pH8)を $0.2\,\mathrm{m}$ 1加えブロッキング処理を行った。

(2)約1000、500、200、100、50、25、10nMに調整した トロンビンレセプター細胞外ドメインペプチド(配列番号 4)の50mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl 溶液(pH7.4)0.1m lを、(1)で得られたトロンビン誘導体固定化キュベットに加え結合曲線を解析した。解析はFAST (it(日製産業)を用い同社マニュアルに順じて行った。

[0056]

<3>APTT測定方法

本実施例において方法に関し特に指定が無い限り、APTTの測定は下記の方法にて行った

標準血漿 (国際試薬社) とサンプルを混和し、総量の25%のAPTT試薬 (国際試薬社) を加え37% 5分インキュベーションを行う。<math>5分後 0.1M $CaCl_2を8\mu$ Mになるよ

うに添加しカルシウム添加後 凝固までの時間を測定する。

[0057]

<4>アンヒドロトロンビンの合成

本実施例中のアンヒドロトロンビンは下記の実験方法によって得たものを使用した。

4-1: アンヒドロトロンビン (AhT) の合成

ヒトThrombin 60mgを100μM PIPES pH6.5 50mlに溶解しAPMSF (WAK0社) 1 0 m g を加え10 分攪拌した。つづいて溶解サンプルを氷水で冷却し、1 N Na0H を6ml加え、10分間反応させた後(氷水中で反応)、5 M NaCl 14mlとglycerol 70mlを加え攪拌し、1 M PIPES (pH6.5)にてpH8.0へ調整した。さらに、0.1M NaHCO3 - 0.5M NaCl 560ml 中へ、調整サンプルを滴下希釈し、0.1M NaHCO3 - 0.5M NaClにて透析を行った。引き続き透析サンプルを、8.000rpm 5min. 遠心沈殿除去後、サンプルを最終100mlへ濃縮した。

Anti-Thrombin (AT) 50単位/ml 1 ml にHeparine 10 m g を加えたものを濃縮後のサンプルに加え、50 mM NaHCO3 - 0.3 M NaClに透析する。その後、8.000 rpm 5 min. 遠心沈殿除去した。

[0058]

4-2:AhTの精製

50mM NaHCO3にて平衡化したBenzamidine-Separose (50ml) にAで得られたサンプル50mlを添加し(流速2ml/min)、50mM NaHCO3 - 0.1M NaClにて洗浄後、0.1M Benzamidine - 50mM NaHCO3 - 0.1M NaClにて溶出した。BCAにて蛋白の確認をし、AhT蛋白の含まれる画分を、50mM NaHCO3にて平衡化したHeparine-Separoseに添加し(流速2ml/min)その後、1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5にて洗浄し、benzamidine除去後、1mM PIPES - 1M NaCl pH6.5にてAhTを溶出させた。溶出画分に、APMSFを10mg添加し、1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5に透析した。

[0059]

4-3:2回目ベンズアミジン精製

つづいて再度カラム添加直前に、サンプルにAPMSFを 1 m g 加之、1mM PIPES pH6.5にて平衡化したBenzamidine-Separoseカラムに添加した。1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5にて洗浄後、0.1M Benzamidine - 1mM PIPES - 0.1M NaCl pH 6.5にて溶出し、1 mM PIPES pH6.5にて平衡化したHeparine-SeparoseにAhT画分を添加し、1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5にて洗浄後、1mM PIPES - 1M NaCl pH6.5にて溶出させた。

 $[0\ 0\ 6\ 0\]$

4-4:3回目ベンズアミジン精製

得られたサンプルにAPMSFを10mg添加し、1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5にて透析後、2回目ベンズアミジン精製同様の操作にてAhTを精製し、ヘバリン溶出AhTに再度1mgのAPMSFを添加した。約30mgのアンヒドロトロンビンが回収された。

 $[0\ 0\ 6\ 1]$

[実験例1]

(1)ヒト野生型トロンビンの発現

[0062]

(2) ヒト野生型トロンビンのエカリンによる活性化及び活性化ヒト野生型トロンビンの ヒルジン(末端ペプチドカラム結合性の確認 得られたヒト野生型トロンビンを $5 \,\mathrm{mg}$ 含む分画約 $1 \,\,0 \,\,0 \,\,\mathrm{ml}$ を $2 \,\,\mathrm{U}$ ットルの $5 \,\,0 \,\,\mathrm{mM}$ トリス塩酸緩衝液、 $0 \,\,.\,\,1 \,\,5 \,\,\mathrm{M}$ NaCl, $5 \,\,\mathrm{mM}$ 、CaCl $_2$ (pH8) 溶液に透析した後 エカリン (シグマ社) $1 \,\,0 \,\,0$ unitsを加え $37 \,\,\mathrm{C}$ 24時間インキュベーションした。エカリン処理後の一部を用い方法 E記載のヒルジン C 末端結合実験を行ったところ、素通り分画にはトロンビンは確認できず、溶出分画にトロンビンのバンドが確認された。

[0063]

(3)ヒト野生型トロンビンの精製

次にヒルジン(末端結合実験に使用した残りのエカリン活性化後のトロンビンを含む溶液 $9.8\,m\,l\,e$ 、 $5.0\,m\,M$ トリス塩酸緩衝液、 $0.1\,M\,N\,a\,C\,l\,(p\,H\,8)$ で平衡化した硫酸化セルロファインカラム (チッソ社) $2.0\,0\,m\,l\,$ に添加し、同緩衝液 $2.0\,0\,m\,l\,$ で同カラムを洗浄した後、 $5.0\,m\,M$ トリス塩酸緩衝液、 $1.M\,N\,a\,C\,l\,(p\,H\,8)$ にで溶出した。 さらに溶出液を $5.0\,m\,M$ トリス塩酸緩衝液、 $0.1\,M\,N\,a\,C\,l\,(p\,H\,8)$ に透析し 同緩衝液で平衡化されたヒルジン(末端ペプチドカラム (ヒルジン(末端ペプチドを $2.0\,0\,m\,g$ 、NHS活性化セルロファイン (チッソ社) $e.3.0\,m\,l\,$ とした以外は、前述の「方法(:ヒルジン、(1) ヒルジン(末端ペプチドゲルの作製」に記載の方法に準じて作製した) $3.0\,m\,l\,$ に添加した。 $5.0\,m\,M\,$ トリス塩酸緩衝液、 $1.0\,m\,M\,$ で該ヒルジン(末端ペプチドカラムを洗浄した後、 $5.0\,m\,M\,$ トリス塩酸緩衝液、 $1.0\,m\,M\,$ 0でに下出ででは一次で表出し、 $0\,m\,M\,$ 1に認識化されたヒルジン結合性のヒト野生型トロンビン $0.0\,m\,M\,$ 1 の $0.0\,m\,M\,$ 2 の $0.0\,m\,M\,$ 3 の $0.0\,m\,M\,$ 4 の $0.0\,m\,M\,$ 5 の $0.0\,m\,M\,$ 6 の $0.0\,m\,M\,$ 6 の $0.0\,m\,M\,$ 6 の $0.0\,m\,M\,$ 7 の $0.0\,m\,M\,$ 6 の $0.0\,m\,M\,$ 7 の $0.0\,m\,M\,$ 7 の $0.0\,m\,M\,$ 7 の $0.0\,m\,M\,$ 9 の $0.0\,m\,M\,$ 9

$[0\ 0\ 6\ 4]$

[実験例2]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをグリシンに置換したトロンビン (以下203A205Gトロンビン) の発現

203A205GトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。 203A205Gトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号7に示す。

203A205Gトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じて硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上でほぼ純化された203A205Gトロンビンが約5mg得られた。

[0065]

- (2) 203A 205Gトロンビンの基質分解活性測定
- (1)で得られた203A205Gトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の有意な増加はみられなかった。

さらに、203A205Gトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。さらに、203A205Gトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Cに従って測定した結果、クロット形成は確認されなかった。

$[0\ 0\ 6\ 6]$

- (3)203A205Gトロンビンのトロンビンレセプターへの結合能の確認
- (1)で得られた203A205Gトロンビンのトロンビンレセプターへの結合能を、前述の方法Fに従って測定した。203A205Gトロンビンのトロンビンレセプターの解離定数は 3.2μ Mであった。

$[0\ 0\ 6\ 7]$

(4) 203A205Gトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定

 50μ g/mlの203A205Gトロンビン(PBS;137mM NaCl,2.68mM KCl,8.1mM Na $_2$ HPO4,1.47mM KH $_2$ PO $_4$ (pH7.4)を 100μ 1を標準血漿(国際試薬社) 100μ 1と混合し、APTTを測定した。PBSのみを同様に添加した標準血漿をコントロールとして測定したところ、コントロールが44秒、203A205Gトロンビンでは48秒であった。

[0068]

(5)PRP(多血小板血漿:platelet rich plasma)を用いた203A205Gトロンビンの抗血

小板機能の評価

評価1:採血直後のクエン酸添加全血 $10\,\mathrm{ml}$ を、 $800\,\mathrm{rpm}$ で15分遠心し、上澄みより $\mathrm{PRP2ml}$ を得た。さらに $2500\,\mathrm{rpm}$ で10分遠心分離することにより PPP (乏血小板血漿: $\mathrm{platelet}$ $\mathrm{poorplasma}$)を得た。 $100\,\mathrm{ml}$ 1添加した場合に $203\,\mathrm{A}205\,\mathrm{G}$ トロンビンの終濃度が $80\,\mathrm{mg}$ / ml 2なるように濃度が調整された、 $203\,\mathrm{A}205\,\mathrm{G}$ トロンビンの $5\,\mathrm{mm}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{mm}$ NaCl ($\mathrm{pH7}$.4) 溶液 $100\,\mathrm{ml}$ 1を $\mathrm{PRP130\,\mathrm{ml}}$ 1に添加し、血小板凝集惹起物質として $5\,\mathrm{mm}$ g/ ml リストセチン $5\,\mathrm{mm}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{mm}$ NaCl ($\mathrm{pH7}$.4) 溶液 $35\,\mathrm{ml}$ 1を添加した。コントロールとして、 $\mathrm{PRP130\,\mathrm{ml}}$ 1に、 $5\,\mathrm{mm}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{mm}$ NaCl ($\mathrm{pH7}$.4) $200\,\mathrm{mm}$ NaCl ($\mathrm{pH7}$.4 $200\,\mathrm{mm}$ NaCl ($\mathrm{pH7}$ NaCl ($\mathrm{pH7$

評価 2 : 血小板凝集惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン(ヒト野生型) $5\,\mathrm{m\,M}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{M}$ NaCl (pH7.4) 溶液を用いた以外は、評価(1)の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ 1 に、 $5\,\mathrm{m\,M}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{M}$ NaCl (pH7.4) $100\,\mu$ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800 (東京光電株式会社)を用いて行った。結果を図12に示す

[0069]

(6) 203A205Gトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

203A205Gトロンビン誘導体またはアンヒドロトロンビンの約0.1mg/mlの10mM リン酸緩衝液(pH7.4)溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25 $\mathbb C$ で撹拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、203A205Gトロンビンまたはアンヒドロトロンビン固定化キュベットを得た。(各キュベットに203A205Gトロンビンは4100arc、アンヒドロトロンビンは2400arcそれぞれ結合した。)引き続き 1M エタノールアミン(pH8)を0.2m1加えブロッキング処理を行った。

203A205Gキュベットまたはアンヒドロトロンビンキュベットにそれぞれ100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図13と図14に示す。

図14よりアンヒドロトロンビンキュベットにはフィブリノゲンとFVIIIがほぼ同程度結合しているのに対し、図13より203A205GキュベットにはFVIIIの方がフィブリノゲンより少ない結合が確認された。構造変化を最小にするため単純に活性中心セリンをデヒドロアラニンに変換する事で得られたアンヒドロトロンビンに比較し、203A205Gトロンビンは低いFVIII特異性を有している事が分かった。

又、アンヒドロトロンビンに対し203A205Gトロンビンは固相化量との比で換算にFVIII結合が約11%に低下していた。

そのため203A205GトロンビンはAPTT延長効果が低いものと考えられた。

[0070]

(7) カルボキシル基修飾203A205Gトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APT))及びプロトロンビン時間(PT)の測定

1 mg/5 ml の 203 A 205 G F ロンビン/5 0 m M リン酸緩衝液 0.5 M NaCl (pH6.5) を 0.25 M グリシンエチルエステル 0.5 M NaCl (pH6.5) に 4 C で 3 時間透析した後、1-E thyl-3-(3-d imethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬)を、その濃度が 20 mg/ml になるように添加し、25 C にて 1 時間 インキュベーションし、203 A 205 G F ロンビンのカルボキシル基を修飾した。残存カルボジイミドは終濃度 0.5 M になるようにグリシンを添加し反応を終了させた。

質量分析の結果分子量約1400増加しており約15個のカルボキシル基が修飾されていた

$[0\ 0\ 7\ 1]$

評価 1: APTT測定 1

修飾された203A205Gトロンビン500 μ gを、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 1 m 1 に溶解したもの50 μ lを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:10の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) を、標準血漿(国際試薬社)に1:10(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは38秒であったのに対し、カルボキシル基修飾203A205GトロンビンのAPTTは65秒であった。

評価2:APTT測定2

修飾された203A205Gトロンビン 50μ gを、1m1のPBSに溶解したもの 100μ lを、標準血漿(国際試薬社) 100μ lに添加し、APTTを測定した。PBSを標準血漿(国際試薬社)に同様に添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは44秒であったのに対し、カルボキシル基修飾203A205GトロンビンのAPTTは85秒であった。

[0072]

評価3:PTの測定

修飾された203A205Gトロンビン 500μ gを、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 1 m 1 に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:10の割合となるように添加し、PTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) を、標準血漿(国際試薬社)に1:10 (容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは20秒であったのに対しカルボキシル基修飾203A205GトロンビンのPTは21秒であった。

[0073]

(8) PRP (多血小板血漿: platelet rich plasma) を用いたカルボキシル基修飾203A2056トロンビンの抗血小板機能の評価

評価 2:血小板凝集惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン(ヒト野生型)5 mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 溶液を用いた以外は、評価1の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ 1 に、5 mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 100μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800 (東京光電株式会社)を用いて行った。結果を図2に示す。

図1、図2より、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビンを用いることによって血小板 凝集が低下したことから、該トロンビン誘導体はリストセチン惹起血小板凝集及び修飾トロンビン惹起血小板凝集において抗血小板効果を示すことがわかった。

$[0\ 0\ 7\ 4]$

以上の結果から、203A2056トロンビンは、活性が検出限界以下に低下しているが、基質への結合能は保持していることがわかった。また、APTTの結果および血小板凝集抑制実験の結果から、203A2056トロンビンは 80μ g/mlにおいては抗血栓効果、抗血小板効果を有

していなかったが、約15個のカルボキシル基が修飾を受けたカルボキシル基修飾203A2056トロンビンは低濃度においても十分な抗血栓効果、抗血小板効果を有していることがわかった。

また、IAsysを用いた基質特異性実験より203A205GトロンビンはFVIII特異性が低く、また結合力もアンヒドロトロンビンに比較し固定化蛋白対比では11%程に低下しているため高いAPTT延長効果が無いことが推測される。化学修飾を行った203A205Gトロンビンは後の実験で示す205A43Aトロンビン同等のAPTT延長効果であったが、血小板凝集抑制効果においては205A43Aトロンビンに比較し非常に強い効果を示した。化学修飾を行った205A43Aトロンビンと比較した場合、化学修飾を行った203A205GトロンビンはAPTT延長効果は弱いものも血小板凝集抑制効果は同等に強い性質を示した。

[0075]

- (9) 203A205Gトロンビンのカルボキシル基修飾個数と抗血栓性の関係の評価
- (9)-1. 修飾個数 1 から 1 0 個のカルボキシル基修飾 203A 205G 誘導体の作製

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬)を終濃度 $2 \text{ mg} \sim 2 \text{ 0mg}$ gになるように加え 2 5 \mathbb{C} にて 6 0 分~120 分インキュベーションを行い、203 A 205 Gトロンビンの 2 個~28 個のカルボキシル基を修飾した修飾誘導体 $1 \sim 5$ を得た。

[0076]

(9) −2. PBSに透析した修飾誘導体1~5のAPTT延長効果

修飾された203A205Gトロンビン 50μ gを、1m1のPBSに溶解したもの 100μ lを、標準血漿(国際試薬社) 100μ lに添加し、APTTを測定した。PBSを標準血漿(国際試薬社)に同様に添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。

結果を以下に示す。

203A205Gトロンビン 約0個修飾 APTT 47秒 203A205Gトロンビン修飾誘導体1 APTT 48秒 約1個修飾 56秒 203A205Gトロンビン修飾誘導体2 約3個修飾 APTT 203A205Gトロンビン修飾誘導体3 APTT 61秒 約5個修飾 77秒 203A205Gトロンビン修飾誘導体4 約10個修飾 APTT 203A205Gトロンビン修飾誘導体5 約26個修飾 APTT 60秒

以上よりEDCを用いた203A205Gトロンビンにおいて3 個以上のカルボキシル基修飾によって顕著なAPTT延長効果が確認された。修飾体 $1\sim4$ における修飾前後における回収率は75%以上であった。26 個修飾された誘導体においてはAPTT延長効果は見られるものの、凝集がおき、回収率が40%と低く過度な修飾による回収率の低下が起こることが分かった。

$[0 \ 0 \ 7 \ 7]$

[実験例3]

(1) B鎖205セリンをアラニンに置換したトロンビン(以下205Aトロンビン)の発現205AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号9に示す。

205Aトロンビンを実験例1の(1)の方法に準じて発現させた。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上 ほぼ純化された205Aトロンビンが約6 mg得られた。

[0078]

- (2) 205Aトロンビンの基質分解活性測定
- (1)で得られた205Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を前述の方法Bに従って測定した結果、活性化されたFXIIIのA鎖は確認されなかった。

[0079]

(3)205Aトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定

205Aトロンビン 500μ gを、PBS 1 m 1 に溶解した溶液 100μ 1 を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、205AトロンビンのAPTTは9.5 秒であった。

205Aトロンビン50 μ gを、PBS 1 m l に溶解した溶液100 μ l を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは41秒であったのに対し、205AトロンビンのAPTTは62秒であった。

[0080]

さらに、lmg/5mloo 205Aトロンビン/50mMリン酸緩衝液 0.5M NaCl (pH6.5) を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4 \mathbb{C} で 3 時間透析した後 1 - E thyl-3-(3-dimethylaminopropyl) - carbodiimide (和光純薬) を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、25 \mathbb{C} にて 1 時間 インキュベーションし、205Aトロンビンのカルボキシル基を修飾した。約80%の修飾誘導体が可溶化状態で得られた。

カルボキシル基修飾205Aトロンビン 50μ gを、PBS 1 m 1 に溶解した溶液 100μ 1 を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTは4 2 秒であったのに対し、カルボキシル基修飾205AトロンビンのAPTTは7 9 秒であった。

[0081]

(4) プロトロンビン時間 (PT) の測定

205Aトロンビン及びカルボキシル基修飾205Aトロンビン 50μ gを、PBS1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)にそれぞれ容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは21秒であったのに対し205Aトロンビンは21秒、カルボキシル基修飾205AトロンビンのPTは20秒でありいずれもPTの延長効果は示さなかった。

[0082]

(5) PRP (多血小板血漿: platelet rich plasma) を用いた205Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価1:採血直後のクエン酸添加全血 $10\,\text{ml}$ を、 $800\,\text{rpm}$ で15 分遠心し、上澄みより $PRP\,2\,\text{ml}$ を得た。さらに $2800\,\text{rpm}$ で10 分遠心分離することによりPPP(乏血小板血漿: $p\,\text{latelet}$ $p\,\text{oo}$ $r\,\text{plasma}$)を得た。 $1\,0\,0\,\mu\,1$ 添加した場合に $205\,\text{A}$ トロンビンの終濃度が $70\,\mu\,g\,\text{/m}\,1$ となるように濃度が調整された、 $205\,\text{A}$ トロンビンの $5\,\text{mM}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\text{M}$ NaCl ($p\,\text{H}\,7.4$) 溶液 $1\,0\,0\,\mu\,1$ を $PR\,P\,130\,\mu\,1$ に添加し、血小板凝集惹起物質として $5\,\text{m}\,g\,\text{/m}\,\text{l}$ リストセチン $5\,\text{m}\,\text{M}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\text{M}$ NaCl ($p\,\text{H}\,7.4$) 溶液 $35\,\mu\,1$ を添加した。コントロールとして、 $PR\,P\,130\,\mu\,1$ に、 $5\,\text{m}\,\text{M}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\text{M}$ NaCl ($p\,\text{H}\,7.4$) 溶液 $35\,\mu\,1$ を添加した。コントロールとして、 $PR\,P\,130\,\mu\,1$ に、 $5\,\text{m}\,\text{M}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\text{M}$ NaCl ($p\,\text{H}\,7.4$ $100\,\mu\,1$ を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率(波長 $7\,0\,0\,\text{n}\,\text{m}$)の測定は $E\,\text{ASY}$ $TR\,\text{ACER}$ $E\,\text{T}\,$ -800 (東京光電株式会社)を用いて行った。しかしながら本実験で $70\,\mu\,g\,\text{/m}\,\text{l}$ において血小板凝集抑制効果は確認されなかった。

評価 2 : 血小板凝集惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン(ヒト野生型) $5\,\mathrm{m\,M}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{M}$ NaCl (pH7.4) 溶液を用いた以外は、評価(1)の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ 1 に、 $5\,\mathrm{m\,M}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{M}$ NaCl (pH7.4) $100\,\mu$ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800 (東京光電株式会社)を用いて行った。しかしながら本実験で $70\,\mu$ g/mlにおいては血小板凝集抑制効果は確認されなかった。

以上より、205Aトロンビンは弱いAPTT延長効果が確認された。しかしながら抗血小板効果は確認されなかった。

[0083]

(6) PRPを用いた修飾205Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価 1 : 採血直後のクエン酸添加全血 $10\,\mathrm{ml}$ を、 $800\,\mathrm{rpm}$ で 15 分遠心し、上澄みより $PRP 2\,\mathrm{ml}$ を得た。さらに $2800\,\mathrm{rpm}$ で $10\,\mathrm{O}$ 遠心分離することにより PPP を得た。 $100\,\mathrm{ml}$ は 添加した場合に修飾 $205\,\mathrm{A}$ トロンビンの 8 濃度が、 $100\,\mathrm{ml}$ g $/\mathrm{ml}$ になるように 濃度が 調製された、修飾 $205\,\mathrm{A}$ トロンビンの PBS 溶液を、 $100\,\mathrm{ml}$ ずつ $PRP 130\,\mathrm{ml}$ に添加し、 惹起物質として(i) $1\,\mathrm{ml}$ g $/\mathrm{ml}$ カルボキシル基修飾 トロンビン PBS 溶液、(ii) $5\,\mathrm{ml}$ g $/\mathrm{ml}$ リストセチン PBS 溶液 $35\,\mathrm{ml}$ 1を添加した。 コントロールとして、 $PRP 130\,\mathrm{ml}$ 1に、 $5\,\mathrm{ml}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{ml}$ Na $0.1\,\mathrm{ml}$ の $1.15\,\mathrm{ml}$ Na $0.1\,\mathrm{ml}$ の $1.15\,\mathrm{ml}$ Na $0.1\,\mathrm{ml}$ の $1.15\,\mathrm{ml}$ Na $1.15\,\mathrm{ml}$ の $1.15\,\mathrm{ml}$ の 1.

[0084]

(7) 205Aトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

205Aトロンビン約 0.1 mg/ml の濃度の10 mM リン酸緩衝液(pH7.7)溶液を、それぞれNHS 活性化CM デキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10 分間、25 C で撹拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS 活性化CM デキストランキュベットに固定し、205A トロンビン固定化キュベットを得た。(約600 arc 固相化)引き続き 1 M エタノールアミン(pH8)を0.2 ml 加えブロッキング処理を行った。

205Aトロンビンキュベットに100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図23に示す。図23より205AトロンビンはFVIII特異性が増していたがFVIII結合シグナルそのものが相対的にアンヒドロトロンビン(図14)に比較し40%程度にまで低下した。この為、195Aトロンビンはそれほど強い抗血栓能を示さなかったと考えられる。また、195Aトロンビンは修飾することでAPTT延長効果を増し、且つ修飾トロンビン惹起血小板凝集、リストセチン惹起血小板凝集両方に対し抑制効果を示した。

[0085]

[実験例4]

(1) B鎖205セリンをスレオニンに置換したトロンビン(以下205Tトロンビン)の発現205TトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Tトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号11に示す。

205Tトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現させた。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じて硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上 ほぼ純化された205Tトロンビンが約5mg得られた。

[0086]

(2) 205Tトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205Tトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、205Tトロンビンの基質分解活性は、ヒト野生型トロンビンに比較し約2.5 x 10 $^{-4}$ の活性であった。

さらにトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、ほぼ全てのFXIIIのA鎖は野生型トロンビン同様の活性化を受け、分解された活性化血液凝固XIII因子のバンドが確認された。以上より、205Tトロンビンは活性が残存していることがわかった。

[0087]

[実験例5]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをアラニンにB鎖99アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン(203A205A99Nトロンビン)の発現

203A205A99NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成

した。203A205A99Nトロンビン塩基配列を配列番号13に示す。

203A205A99Nトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。<math>SDS-PAGE上ほぼ純化された203A205A99Nトロンビンが約5mg得られた。

[0088]

- (2) 203A205A99Nトロンビンの基質分解活性測定
- (1)で得られた203A205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、203A205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って 測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。

[0089]

(3) 203A205A99Nトロンビン添加血液のAPTTの測定

203A205A99Nトロンビン 100μ gを5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 1 m 1 に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) を、標準血漿(国際試薬社)に容量比1:1 の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、203A205A99NトロンビンのAPTTは60秒であった。以上より、203A205A99Nトロンビンはヒルジンゲルへの結合能を有し且つ、活性が十分に低下しているものも十分な抗血栓効果を有していないことがわかった。

[0090]

[実験例6]

(1)B鎖205セリンをバリンに置換したトロンビン(以下205Vトロンビン)の発現

205VトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Vトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号15に示す。

205Vトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にほぼすべてのトロンビンのバンドが現われ、溶出ピークにはトロンビンのバンドが確認されなかった。これにより、205Vトロンビンは基質結合能が低下していることがわかった。

 $[0\ 0\ 9\ 1]$

[実験例7]

(1)B鎖205セリンをアスパラギン酸に置換したトロンビン(以下205Dトロンビン)の発現

205DトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Dトロンビン塩基配列を配列番号 17に示す。

205Dトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にほぼすべてのトロンビンのバンドが現われ、溶出ピークにはトロンビンのバンドが確認されなかった。これにより、205Dトロンビンは基質結合能が低下していることがわかった。

[0092]

[実験例8]

(1) B鎖205セリンをアスパラギンに置換したトロンビン(以下205Nトロンビン)の発現205NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Nトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号19に示す。

205Nトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にほぼすべてのトロンビンのバンドが現われ、溶出ピークにはトロンビンのバンドが確認されなかった。これにより、205Nトロンビンは基質結合能が低下していることがわかった。

[0093]

[実験例9]

アンヒドロトロンビンのトロンビンレセプター結合能の測定を、方法 D により測定したところ、該アンヒドロトロンビンとトロンビンレセプターの解離定数は1.2μMであった。

 $[0\ 0\ 9\ 4\]$

[実験例10]

(1)B鎖205セリンをアラニンにB鎖99アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン (205A99Nトロンビン)の発現

205A99NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した

205A99Nトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号21に示す。

205A99Nトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された205A99Nトロンビンが約5.5mg 得られた。

[0095]

(2) 205A99Nトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。

[0096]

(3) 205A99Nトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定 205A99Nトロンビン 50μ gを、PBS 1mlに溶解し、その 100μ 1 を、標準血漿(国際試薬社)に 100μ 1 と混和し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、205A99NトロンビンのAPTTは58秒であった。

[0097]

[実験例11]

(1) B鎖203 グリシンをアラニンにB鎖205セリンをアラニンに置換したトロンビン(203 A 205 Aトロンビン)の発現

203A205AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。203A205Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号23に示す。

203A205Aトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された203A205Aトロンビンが約4mg得られた。

[0098]

(2) 203A205Aトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた203A205Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、203A205Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。203A205Aトロンビンはヒルジン05Aトロンビン05Aトロンビン05Aトロンビン000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000 000

るように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、203A205AトロンビンのAPTTは59秒であった。

[0099]

(3) カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、lmg/5mlの203A205Aトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5) を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4 $\mathbb C$ で 3 時間透析した後 1 – E thyl-3 – (3 – d imethylaminopropyl) – c arbodi i mide (和 光純薬)を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、25 $\mathbb C$ にて 1 時間 インキュベーションし、203A205Aトロンビンのカルボキシル基を修飾した。可溶化状態で約80%の修飾体が回収された。

カルボキシル基修飾203A205Aトロンビン 50μ gを、PBS 1 m 1 に溶解した溶液 100μ 1 を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 で添加したものをコントロールとし、APTT を測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは45秒であったのに対し、カルボキシル基修飾203A205Aトロンビンはそれぞれ46秒であった。

$[0\ 1\ 0\ 0\]$

(4) プロトロンビン時間 (PT) の測定

203A205Aトロンビン及びカルボキシル基修飾203A205Aトロンビン 50μ gを、PBS1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)にそれぞれ容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBO PLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは20秒であったのに対し203A205Aトロンビンは21秒、カルボキシル基修飾203A205AトロンビンのPTは20秒でありいずれもPTの延長効果は示さなかった。

$[0\ 1\ 0\ 1\]$

(5) PRPを用いた203A205Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価 1 : 採血直後のクエン酸添加全血 $10\,\mathrm{ml}$ を、 $800\,\mathrm{rpm}$ で $15\,\mathrm{分遠心}$ し、上澄みより $PRP\,2\,\mathrm{ml}$ を得た。さらに $2800\,\mathrm{rpm}$ で $10\,\mathrm{分遠心}$ 分離することにより PPP を得た。 $100\,\mu$ 1 添加した場合に $203\,\mathrm{A}\,2\,05\,\mathrm{A}$ トロンビンの $8\,\mathrm{ml}$ 度が、 $100\,\mu$ g $/\mathrm{ml}$ になるように 濃度が 調製された、 $203\,\mathrm{A}\,2\,05\,\mathrm{A}$ トロンビンの PBS 溶液を、 $100\,\mu$ g $/\mathrm{ml}$ に添加し、 惹起物質として(i) $1\,\mu$ g $/\mathrm{ml}$ カルボキシル基修飾 トロンビン PBS 溶液、 (ii) $5\,\mathrm{mg}$ $/\mathrm{ml}$ リストセチン PBS 溶液 $35\,\mu$ 1 を添加した。 コントロールとして、 $PRP\,130\,\mu$ 1 に、 $5\,\mathrm{mM}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{M}$ Na $01\,\mathrm{mm}$ り $100\,\mu$ 1 を添加し 血小板凝集抑制実験を行ったが (i) (ii) いずれの惹起物質に対してもコントロールと $203\,\mathrm{A}\,2\,05\,\mathrm{A}$ トロンビンに 違いは 無かった。

$[0\ 1\ 0\ 2]$

(6)203A205Aトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

203A205Aトロンビン約0.1mg/mlの濃度の10mM リン酸緩衝液(pH7.7)溶液を、それぞれ NHS活性化0Mデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25 $\mathbb C$ で撹拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS活性化0Mデキストランキュベットに固定し、203A205Aトロンビン固定化キュベットを得た。(約600arc 固相化)引き続き 1M エタノールアミン(pH8)を0.2ml加之ブロッキング処理を行った。203A205Aトロンビンキュベットに100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図 24 に示す。図 24 より203A205AトロンビンはFVIII及びフィブリノゲン両方にアンヒドロトロンビンと比較すると固定化蛋白量との対比による値で約5%のシグナルしか示さなかった。本配列の誘導体の基質結合能そのものが低下しそれによって抗凝固能を有さなかった推測される。

$[0\ 1\ 0\ 3]$

[実験例12]

(1) B鎖205セリンをアラニンに、B鎖43ヒスチジンをアラニンに置換したトロン

ビン (205A43Aトロンビン) の発現

205A43AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205A43Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号25に示す。

205A43Aトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。<math>SDS-PAGE上ほぼ純化された205A43Aトロンビンが約3mg得られた。

$[0\ 1\ 0\ 4\]$

(2) 205A43Aトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205A43Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

205A43Aトロンビン 50μ gを、PBSImIに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは46秒であったのに対し、205A43AトロンビンのAPTTは78秒であった。

[0105]

(3) PTの測定:205A43Aトロンビン 50μ gを、PBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。またPBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは24秒であったのに対し、205A43AトロンビンのPTは25秒であった。

[0106]

(4) カルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定

1 mg/5ml の 205 A43G トロンビン / 50 mM リン酸緩衝液 / 0.5 M NaCl (pH6.5) を 0.2 5M グリシンエチルエステル / 0.5 M NaCl (pH6.5) に 4 C で 3 時間透析した後、 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬) を、その濃度が 20 mg/ml になるように添加し、 25 C にて 1 時間 インキュベーションし、 205 A43A トロンビンのカルボキシル基を修飾した。修飾体の質量分析の結果、約 16 個のカルボキシル基が修飾された。

$[0\ 1\ 0\ 7]$

修飾された205A43Aトロンビン 50μ gをPBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT 試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは46秒であったのに対し、修飾205A43AトロンビンのAPTTは190秒であった。

[0108]

(5) プロトロンビン時間 (PT) の測定

カルボキシル基修飾 205A43Aトロンビン 50μ gを、PBS 1 m 1 に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で 1:1 の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に 1:1 (容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬には SIGMA社の THROMBOPLASTIN WITH GALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは 22秒であったのに対しカルボキシル基修飾 205A43AトロンビンのPTは 23秒であり修飾体においても 205A43AトロンビンはPTの延長効果は示さなかった。

$[0\ 1\ 0\ 9\]$

(6) PRPを用いた205A43Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価1:採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを

得た。さらに 2800 r pmで 10 分遠心分離 することにより PPPを得た。 100 μ 1 添加した場合に 205 A4 3 Aトロンビンの終濃度が、 30 μ g / m 1 になるように濃度が調製された、 205 A4 3 Aトロンビンの PBS 溶液を、 100 μ 1 ずつ PRP 130 μ 1 に添加し、惹起物質として 5 m g / m 1 リストセチン PBS 溶液 35 μ 1 を添加した。 コントロールとして、 PRP 130 μ 1 に、 5 m M リン酸緩衝液 0.15 M NaCl、 pH7. 4 100 μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。 結果を図 3 に示す。

評価 2 : 惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液を用いた以外は、評価 1 の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP 130μ 1 に、PBS 100μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図 4 に示す。

評価3:惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液を用い 100μ l 添加した場合に205A43Aトロンビンの終濃度が、それぞれ 120μ g/ml、205A43AトロンビンのPBS溶液を加え、評価1の方法に準じて実験を行った。結果を図15に示す。

評価 4:205A43Aトロンビンの終濃度が、 150μ g/mlになるように濃度が調製された、205A43AトロンビンのPBS溶液を、 100μ lずつPRP1 30μ lに添加し、惹起物質として 5 mg/mlリストセチン PBS 溶液 35μ lを添加した。コントロールとして、PRP1 30μ lに、PBS 100μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。205A43Aトロンビンは高濃度においてもリストセチン惹起血小板凝集抑制効果は確認されなかった。

$[0\ 1\ 1\ 0\]$

(7) PRPを用いたカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価1:採血直後のクエン酸添加全血 $10\,\text{ml}$ を、 $800\,\text{rpm}$ で15分遠心し、上澄みより $PRP2\,\text{ml}$ を得た。さらに $2500\,\text{rpm}$ で10分遠心分離することによりPPPを得た。 $100\,\mu$ 1添加した場合、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの終濃度が、それぞれ $30\,\mu$ g/m $1、15\,\mu$ g/m $1、7.5\,\mu$ g/m1になるように濃度が調整された、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの $5\,\text{mM}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\text{M}$ NaCl(pH7.4) 溶液 $3\,\text{tm}$ 種類を、それぞれ $100\,\mu$ 1 ずつ $PRP130\,\mu$ 1 に添加し、惹起物質として $5\,\text{tm}$ g/m1リストセチン $5\,\text{tm}$ M リン酸緩衝液 $0.15\,\text{M}$ NaCl(pH7.4) 溶液 $35\,\mu$ 1 を添加した。コントロールとして、 $PRP130\,\mu$ 1 に、 $5\,\text{tm}$ M リン酸緩衝液 $0.15\,\text{M}$ NaCl(pH7.4) $100\,\mu$ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定は $EASY\,TRACER\,ET-800\,$ (東京光電株式会社)を用いて行った。結果を図 $5\sim7$ に示す。

評価 2 : 惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン 5 m M リン酸緩衝液 0.15 M NaCl (pH7.4) 溶液を用いた以外は、評価(1)の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ 1 に、 5 m M リン酸緩衝液 0.15 M NaCl (pH7.4) 100 μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定は EASY TRACER ET-800 (東京光電株式会社)を用いて行った。結果を図8~10に示す。

(8) 205A43Aトロンビン及びアンヒドロトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合 特異性の比較

205A43Aトロンビン誘導体及びアンヒドロトロンビンの約0.1mg/m1の濃度の10mM リン酸緩衝液(pH7.7)溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25 $\mathbb C$ で撹拌することにより、被験サンブル(トロンビン誘導体)をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、205A43Aトロンビン及びアンヒドロトロンビン固定化キュベットを得た。1307arcの205A43Aトロンビンがキュベットに固定化された。引き続き 1M エタノールアミン(pH8)を0.2m1加えブロッキング処理を行った。205A43A キュベット及びアンヒドロトロンビンキュベットに100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図16 および図14 に示す。図14 よりアンヒドロトロンビンキュベットにはフィブリノゲンとFVIIIがほぼ同程度結合しているのに対し、図16 から205A43AキュベットにはアイブリノゲンとFVIIIがほぼ同程度結合しているのに対し、図16 から205A43Aキュベットには100000万がフィブリノゲンより多い結合が確認された。また、アンヒドロトロンビンに対し固定化蛋白との対比で同等の1000000円列

[0112]

(9) 205A43Aトロンビンの修飾個数とAPTT延長効果の実験

1 mg/5ml の 205 A43A トロンビン $\angle / 5$ 0 mM リン酸緩衝液 0.5 M NaCl (pH6.5) を 0.25 M グリシンエチルエステル 0.5 M NaCl (pH6.5) に 4 C で 3 時間透析した後、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬)を、その濃度が <math>20 mg/ml になるように添加し、25 C にて 10 O 、60 O 、120 O 反応させカルボキシル基を修飾した。各反応時間に残存カルボジイミドを終濃度 0.5 M になるようにグリシンを添加し反応を終了させた。

未反応205A43Aトロンビンに比較し10分反応サンプルは約480Da増加(5.6個修飾に相当) 60分後 1240Da増加(14.6個修飾に相当)、120分後 1900(22.4個修飾に相当)するカルボキシル基修飾反応が確認された。

$[0\ 1\ 1\ 3\]$

各修飾体のAPTT延長効果

各修飾体をそれぞれ50、25、12.5 μ g/m l に調整しPBSに透析した。各サンプルと標準血漿を l : l に混合しAPTTを測定した。

測定結果を下記に示す。

$[0\ 1\ 1\ 4\]$

【表 1】

	表 1			
	APTT		平均(秒)	比
透析外液コントロール	42	42	42	1
O分 サンプル濃度 12.5 µ g/ml	61	62	61.5	1.46
O分 サンプル濃度 25 μ g/ml	70	71	70.5	1.68
O分 サンプル濃度 50 μ g/ml	83	80	81.5	1.94
10分 サンプル濃度 12.5 µg/ml	87	89	88	. 2.1
10分 サンプル濃度 25 µ g/ml	100	103	101.5	2.42
10分 サンプル濃度 50 µ g/ml	118	114	116	2.76
60分 サンプル濃度 12.5 µ g/ml	88	90	89	2.12
60分 サンプル濃度 25 µ g/ml	110	112	111	2.64
60分 サンプル濃度 50 µ g/ml	140	143	141.5	3.37
120分 サンプル濃度 12.5 µ g/ml	88	90	89	2.12
120分 サンプル濃度 25 µ g/ml	137	125	131	3.12
120分 サンプル濃度 50 µ g/ml	240	250	245	5.83

共 7

$[0\ 1\ 1\ 5]$

以上の結果より 205A43Aトロンビンにおいては5.6個の修飾においても未修飾よりもAPTT の延長効果の増強が確認された。14.6、22.4個と修飾数が増えるにつれAPTT延長効果は増加したが 22.4個修飾においては回収率は約50%にまで低下した。回収率とAPTT延長効果の観点から5個以上の修飾が修飾によるAPTT延長効果には効率的であるが22個以上の修飾は回収率の低下があることが確認された。

構造変化を最小にするため単純に活性中心セリンをデヒドロアラニンに変換する事で得られたアンヒドロトロンビンに比較し、205A43Aトロンビンは高いFVIII特異性を有している事が分かった。

$[0\ 1\ 1\ 6\]$

以上の結果から、205A43Aトロンビン誘導体は化学修飾の有無に関わらず強いAPTT延長効果を有した。また化学修飾によってさらにAPTT延長効果は増加した。M-トロンビン惹起血小板凝集抑制(PAR1活性化阻害)に依存した血小板凝集抑制効果は化学修飾の有無にかかわらず有したが、化学修飾後の方が非常に強いものであった。したがって、205A43Aトロンビン誘導体はAPTTを中心とした血液凝固に主に強く作用し且つおだやかな血小板凝集

抑制効果を有するのに対し、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン誘導体はAPTTと共に強い抗血小板能を有する事が分かった。修飾された205A43AトロンビンはM-トロンビン惹起血小板凝集抑制(PAR1活性化阻害)に加えリストセチン惹起血小板凝集抑制効果も有していたが、修飾をしていない205A43Aトロンビンは高濃度においてもリストセチン惹起血小板凝集を有してはいなかった。よって下記に示される特徴を有した抗血栓トロンビンが得られた。

修飾205A43Aトロンビン

APTT延長効果(大)、PAR1阻害(大)、リストセチン惹起血小板凝集(大)

205A43Aトロンビン

APTT延長効果(大)、PAR1阻害(小)、リストセチン惹起血小板凝集(無し)

また、lasysを用いた基質特異性確認実験において205A43Aトロンビンが非常に高いAPTT 延長効果を有していた理由として、活性中心セリン及びヒスチジンを同時に変異させた本誘導体がその変異によって、完全に基質分解活性を失うとともに、アンヒドロトロンビンに比較し高いFVIII特異性(フィブリノゲンに対し特異性が低下)を有していたためと推測された。

後述の実験例16および17記載のように他のアミノ酸の置換の組み合わせにおいても活性中心Ser、His を同時に変異させた誘導体はAPTT延長を主効果とした高い抗血栓能を有する事がわかった。

$[0\ 1\ 1\ 7]$

[実験例13]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをグリシンにB鎖77リシンをグルタミン酸に置換したトロンビン(77E203A205Gトロンビン)の発現

77E203A205GトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。77E203A205Gトロンビン塩基配列を配列番号27に示す。

77E203A205Gトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された77E203A205Gトロンビンが約3mg得られた。

[0118]

(2)77E203A205Gトロンビン添加血液のAPTTの測定

77E203A2056トロンビン 50μ gをPBSに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で 1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。同様にPBSを、標準血漿(国際試薬社)に容量比 1:1 の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTT は 4 4 秒であったのに対し、77E203A2056トロンビンのAPTTは 7 4 秒であった。

$[0\ 1\ 1\ 9\]$

(3)PRPを用いた77E203A205G トロンビンの抗血小板機能の評価

評価 1 : 採血直後のクエン酸添加全血 $10\,\mathrm{ml}$ を、 $800\,\mathrm{rpm}$ で 15 分遠心し、上澄みより $PRP2\,\mathrm{ml}$ を得た。さらに $2800\,\mathrm{rpm}$ で 10 分遠心分離することにより PPP を得た。 $100\,\mu$ 1 添加した場合に $77\,\mathrm{E}\,203\,\mathrm{A}\,205\,\mathrm{G}$ トロンビンの終濃度が、 $70\,\mu$ g $/\mathrm{ml}$ になるように濃度が調製された、 $77\,\mathrm{E}\,203\,\mathrm{A}\,205\,\mathrm{G}$ トロンビンの PBS 溶液を、 $100\,\mu$ 1 ずつ $PRP130\,\mu$ 1 に添加し、惹起物質として $5\,\mathrm{mg}/\mathrm{ml}$ リストセチン PBS 溶液 $35\,\mu$ 1 を添加した。 コントロールとして、 $PRP130\,\mu$ 1 に、 $5\,\mathrm{mM}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{M}$ NaCl、 pH7.4 $100\,\mu$ 1 を添加し透過率の経時変化を記録したが リストセチン惹起血小板凝集抑制作用は確認されなかった。

評価 2 : 惹起物質として 1μ g /mlカルボキシル基修飾トロンビン PBS 溶液を用いた以外は、評価 1 の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、 PRP 130μ 1 に、 PBS 100μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録したが、カルボキシル基修飾トロンビン惹起血小板凝集抑制作用を示さなかった。

以上より、203A205Gトロンビンは十分な抗血栓能を有していなかったが77E203A205Gト

ロンビンは77リシンの置換によりフィブリノゲン親和性を低下させることにより大幅なAPTT延長効果の増加が起こった。また、77E203A205Gトロンビンは修飾トロンビン及びリストセチン惹起抗血小板凝集に対し抑制効果を示さなかった。

$[0 \ 1 \ 2 \ 0]$

(4)カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、lmg/5mlの77E203A205Gトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5) を 0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に 4℃で3時間透析した後 <math>l-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬)を、その濃度が<math>20mg/mlになるように添加し、25 にて 1 時間 インキュベーションし、77E203A205Gトロンビンのカルボキシル基を修飾した。可溶化状態で約<math>35%の修飾体が回収された。

カルボキシル基修飾 77E203A205G トロンビン 50μ gを、PBS 1m1 に溶解した溶液 100μ lを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で 1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に 1:1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは 45 秒であったのに対し、カルボキシル基修飾 77E203A205GトロンビンのAPTTは 45 秒であった。

$[0 \ 1 \ 2 \ 1]$

(5) プロトロンビン時間 (PT) の測定

77E203A205Gトロンビン及びカルボキシル基修飾77E203A205Gトロンビン50 μ gを、PBS1m1に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)にそれぞれ容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは20秒であったのに対し77E203A205Gトロンビンは22秒、カルボキシル基修飾77E203A205GトロンビンのPTは23秒でありいずれもPTの延長効果は示さなかった。

[0122]

$[0\ 1\ 2\ 3\]$

評価 2 : 惹起物質として 1μ g /ml カルボキシル基修飾トロンビン PBS 溶液を用いた以外は、評価 1 の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、 PRP 130μ 1 に、 PBS 100μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図 2 6 に示す。

以上の結果より修飾77E203A205Gトロンビンは化学修飾前に比較しAPTT延長効果の増強は確認されなかったが、修飾トロンビン惹起血小板凝集、リストセチン惹起血小板凝集抑制効果を示した。また、77のグルタミン酸への置換により置換前に比較し回収率の顕著な低下が確認された。

[0124]

(7)203A205G77Eトロンビンのフィブリノゲン及びトロンボモジュリンへの結合特異性の確認

203A205Gトロンビン誘導体の0.1 mg/ml 10 mM リン酸バッファー (pH7.7) 溶液、および203A205G77Eトロンビン誘導体の0.1 mg/ml 10 mM リン酸バッファー (pH7.7) 溶液を、それぞれNHS活性化0 M デキストランキュベット (日製産業社)に添加し、10 分間 25 C で撹拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS活性化0 M デキストランキュベットに固定し、203 A 205 G トロンビン固定化キュベットおよび203 A 205 G 77Eトロンビン固

定化キュベットを得た。203A205Gキュベットには約4100arcの蛋白質が203A205G77Eキュベットには約2000arcの蛋白質が固相化された。引き続き1M エタノールアミン(pH8)を0.2m1加えブロッキング処理を行った。

さらに両キュベットを同様に洗浄、再生後、両キュベットに500nMの血液凝固第8因子溶液(50mM Tris塩酸 0.15M NaCl 10mM CaCl₂(pH7.4)に溶解)を 100μ 1加之たところ3分後203A205Gトロンビン固相化キュベットには約300arc secの血液凝固第8因子が吸着され、203A205G77Eトロンビン固相化キュベットには約300arc secの血液凝固第8因子が吸着された。

さらに両キュベットを $50\,\mathrm{mM}$ リン酸緩衝液、 $2\,\mathrm{M}$ NaCl、 $30\,\mathrm{mM}$ ベンズアミジン(pH7.4)で洗浄、再生後、 $203\,\mathrm{A}205\,\mathrm{G}$ トロンビン固定化キュベットおよび $203\,\mathrm{A}205\,\mathrm{G}$ 77Eトロンビン固定化キュベットそれぞれに、 $50\,\mathrm{nM}$ の可溶性トロンボモジュリン溶液(コスモバイオ)($50\,\mathrm{mM}$ リン酸緩衝液、 $0.15\,\mathrm{M}$ NaCl(pH7.4)に溶解)を $100\,\mu$ 1 加えたところ、 $3\,\mathrm{G}$ 後 $20\,\mathrm{A}205\,\mathrm{G}$ トロンビン固相化キュベットには約 $100\,\mathrm{arc}$ secのトロンボモジュリンが吸着され、 $203\,\mathrm{A}205\,\mathrm{G}$ 77Eトロンビン固相化キュベットには約 $20\,\mathrm{arc}$ secのトロンボモジュリンが吸着された。

以上の結果より203A205Gトロンビン誘導体に新たにB鎖77リシンのグルタミン酸への置換を加えることでキュベット上で血液凝固第8因子吸着に対してフィブリノゲン吸着量は約3分の1に トロンボモジュリン吸着は約2分の1に低下している事がわかった。

また I A s y s F A S T F I T P R O G R A M (日製産業) による解析の結果 203A2056 に対するフィブリノゲン結合定数は 10.8n M、血液凝固第 8 因子親和性は 5.07n M、203A205 G 77E に対するフィブリノゲン親和性は 190n M、血液凝固第 8 因子親和性は 22.5n M であった。

このB鎖77リシンの置換によりフィブリノゲンに対するFVIII特異性の向上に起因し実験例13に記載の77E203A205Gトロンビン誘導体は203A205Gトロンビン誘導体に比較し高いAPTT延長能を有している事が予測された。

[0125]

[実験例14]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをアラニンにB鎖99アスパラギン酸をアスパラギンにB鎖77リシンをグルタミン酸に置換したトロンビン (77E203A205A99Nトロンビン) の発現

77E203A205A99NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。77E203A205A99Nトロンビン塩基配列を配列番号29に示す。

77E203A205A99Nトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された77E203A205A99Nトロンビンが約3mg得られた。

[0126]

(2) 77E203A205A99Nトロンビン添加血液のAPTTの測定77E203A205A99Nトロンビン 50μ g をPBSに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。同様にPBSを、標準血漿(国際試薬社)に容量比1:1 の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは41 秒であったのに対し、77E203A205A99NトロンビンのAPTTは39 秒であった。以上より、77E203A205A99Nトロンビ

ンはヒルジンゲルへの結合能を有し且つ、活性が十分に低下し且つフィブリノゲン親和性を低下させる変異を加えてはているものも十分な抗APTT効果を有していないことがわかった。

$[0 \ 1 \ 2 \ 7]$

実験例15

B鎖203グリシンをアラニンに置換したトロンビン(203Aトロンビン)の発現

203AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。203Aトロンビン塩基配列を配列番号31に示す。

203Aトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された<math>203Aトロンビンが約2mg得られた。

203Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した。結果を図20に示す。FXIIIのA鎖は30分後においてすでに分解物が確認され3時間後には半量以上が分解を受けた。

さらに、203Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法(に従って測定した結果、3時間後クロットが形成された。

以上の結果より 203Aトロンビンは 非特許文献 5 において完全に活性を失った誘導体と報告されているものも、本発明における蛋白基質を用いた活性測定法においては、抗血栓剤として使用する目的においては明らかな蛋白基質分解活性が確認され抗血栓剤として使用することが困難であることが分かった。

[0128]

実験例16

(1) 205セリンをグリシンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン (205G43Aトロンビン) の発現

205643AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205643Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号33に示す。

205643A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された205643A トロンビンが約0.5mg得られた。

 $[0\ 1\ 2\ 9\]$

(2) 205G43A トロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205G43Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、205643A トロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。205643A トロンビンはヒルジン6 末端ペプチド結合性を有し且つ十分に活性を失っていることが分かった。205643A トロンビン 24μ g及び 12μ gを、PBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは43 秒であったのに対し、205643A トロンビンのAPTTは470 であったのに対し、205643A トロンビンのAPTTは470 であったのに対し、205643A トロンビンのAPTTは470 であったのに対し、205643A トロンビンのAPTTは470 であったのに対し、471 に

以上の結果より、活性中心のセリン、ヒスチジンを同時に置換した205G43Aトロンビンは 低濃度においても化学修飾を行わずに高いAPTT延長効果を示すことがわかった。

$[0\ 1\ 3\ 0\]$

実験例17

(1) 205セリンをアラニンに43ヒスチジンをセリンに置換したトロンビン(205A43Sトロ

ンビン) の発現

205A43SトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205A43Sトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号35に示す。

205A43S トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された205A43S トロンビンが約3mg得られた。

$[0\ 1\ 3\ 1\]$

(2) 205A43S トロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205A43S トロンビンの基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。205A43S トロンビンはヒルジンC 末端ペプチド結合性を有し且つ十分に活性を失っていることが分かった。次に205A43S トロンビン 40μ gを、PBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは42秒であったのに対し、203A205SトロンビンのAPTTは72秒であった。

以上の結果より、活性中心のセリン、ヒスチジンを同時に置換した205A43S トロンビンは 化学修飾を行わずに高いAPTT延長効果を示すことがわかった。

[0132]

(3) 205A43Sトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

205A43Sトロンビン誘導体またはアンヒドロトロンビンの 約 $0.1 \, \mathrm{mg/ml}$ の $10 \, \mathrm{nM}$ リン酸緩衝液(pH7.4)溶液を、NHS活性化 $0.0 \, \mathrm{mm}$ デストランキュベット(日製産業社)に添加し、 $10 \, \mathrm{cm}$ 分間、 $25 \, \mathrm{cm}$ で撹拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS活性化 $0.0 \, \mathrm{cm}$ キストランキュベットに固定し、 $205 \, \mathrm{A43S}$ トロンビンまたはアンヒドロトロンビン固定化キュベットを得た。約 $1200 \, \mathrm{arc}$ の $205 \, \mathrm{A43S}$ トロンビンがキュベットに固定化された。引き続き $1.0 \, \mathrm{mm}$ エタノールアミン($0.0 \, \mathrm{mm}$ のフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ のフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ のフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ がいまたはアンヒドロトロンビンキュベットに $0.0 \, \mathrm{mm}$ のフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ かった。図 $0.0 \, \mathrm{mm}$ のフィブリノゲンよなは $0.0 \, \mathrm{mm}$ かった。図 $0.0 \, \mathrm{mm}$ のフィブリノゲンよりを $0.0 \, \mathrm{mm}$ がいまたはアンヒドロトロンビンキュベットにはフィブリノゲンと $0.0 \, \mathrm{mm}$ のフィブリノゲンよりのに対し、図 $0.0 \, \mathrm{mm}$ のおいまりをからにはフィブリノゲンと $0.0 \, \mathrm{mm}$ のフィブリノゲンよりを $0.0 \, \mathrm{mm}$ ののフィブリノゲンよりを $0.0 \, \mathrm{mm}$ ののフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ ののフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ がいまた。間に大いなのに対し、図 $0.0 \, \mathrm{mm}$ ののフィブリノゲンよりを $0.0 \, \mathrm{mm}$ ののフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ ののフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ のフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ がいまた。間に大いなのに対し、図 $0.0 \, \mathrm{mm}$ ののフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ ののフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ がいまた。図 $0.0 \, \mathrm{mm}$ ののフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ がいまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ ののフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ がいまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ のフィブリノゲンまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ がいまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ がいまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ がいまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ がいまたは $0.0 \, \mathrm{mm}$ がいまた。

[0133]

実験例18

(1) B鎖77リシンをグルタミン酸に205セリンをアラニンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン(77E205A43Aトロンビン)の発現

77E205A43A トロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。77E205A43A トロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号37に示す。

77E205A43A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC 末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC 末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された77E205A43A トロンビンが約3mg得られた。

$[0\ 1\ 3\ 4\]$

(2) 77E205A43A トロンビン 50μ g及び 25μ gを、PBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、

標準血漿 (国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは45秒であったのに対し、77E205A43AトロンビンのAPTTはそれぞれ92秒、85秒であった。

[0135]

(3) PRPを用いた77E205A43A トロンビンの抗血小板機能の評価

[0136]

評価 2 : 惹起物質として 1μ g /mlカルボキシル基修飾トロンビン PBS 溶液を用いた以外は、評価 1 の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、 PRP 130μ 1 に、 PBS 100μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図 2 7 に示す。

以上の結果より77E205A43A トロンビンは77リシンをグルタミン酸に変化させることでフィブリノゲン親和性を特異的に低下され、もともと活性中心のセリン及びヒスチジンの同時変異によりFVIII特異性が高まり強いAPTT抑制効果を持っていた205A43Aよりも、さらに強いAPTT抑制効果を示すことがわかった。また、77E205A43A トロンビンはリストセチン惹起血小板凝集抑制能は示さなかったが、修飾トロンビン惹起血小板凝集抑制効果は示した。

[0137]

(4)カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、lmg/5mlの77E205A43Aトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5)を<math>0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5)に4℃で3時間透析した後 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)-carbodiimide (和光純薬)を、その濃度が<math>20mg/mlになるように添加し、2.5℃にて0.5時間インキュベーションし、77E205A43A トロンビンのカルボキシル基を修飾した。可溶化状態で約40%の修飾体が回収された。

[0138]

[0139]

評価 2 : 惹起物質として μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン PBS 溶液を用いた以外は、評価 μ 1 の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、 PRP μ 1 に、 PBS μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。修飾 μ 7 を μ 2 0 5 A 4 3 A トロンビンは結果を終濃度 3 0 μ 7 m 1 にてカルボキシル基修飾トロンビン惹起血小板凝集を完全に抑制した。

以上の結果より77E205A43Aトロンビンは修飾によりAPTT延長能が増加した。又、修飾トロンビン惹起血小板凝集及びリストセチン惹起血小板凝集抑制効果も示した。しかしながら77E203A205Gトロンビンのカルボキシル基修飾体同様に77E205A43Aトロンビンは修飾語の回収率はB鎖77のグルタミン酸への置換によって205A43Aトロンビンの修飾体に比較し大きく低下した。

[0140]

実験例19

(1) B鎖24 グルタミンをグルタミン酸に205セリンをアラニンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン (24E205A43Aトロンビン) の発現

24E205A43A トロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。24E205A43A トロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号39に示す。24E205A43A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画に若干のバンドが確認された。また、溶出ピークに大部分のトロンビンのバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った後、組み換えトロンビンを含有した溶出溶液を50mM NaHCO3 pH8に対して透析し、50mM NaHCO3 pH8 で平衡化したHI TRAP ベンズアミジンカラム5 ml(ファルマシア社) にアプライした。50mM NaHCO3 0.3M NaCl pH8にて充分洗浄した後 50mM NaHCO3 0.3M NaCl pH8に入分 0.

24E205A43A トロンビン 50μ gを、PBS 1m1に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは42秒であったのに対し、24E205A43AトロンビンのAPTTは62秒であった。

$[0 \ 1 \ 4 \ 1]$

(2) 24E205A43Aトロンビン及びアンヒドロトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

24E205A43Aトロンビン誘導体又はアンヒドロトロンビンを約0.1 mg/ml含む 10 mM リン酸緩衝液(pH7.4)溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25 $\mathbb C$ で撹拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS 活性化CM デキストランキュベットに固定し、24E205 A43A トロンビン及びアンヒドロトロンビン固定化キュベットを得た。(それぞれ1380 arc, 2400 arc 固相化)引き続き 1 M エタノールアミン(pH8)を0.2 ml加えブロッキング処理を行った。

24E205A43Aトロンビンキュベット及びアンヒドロトロンビンキュベットにそれぞれ100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図18 および図14に示す。

図 18 より 24E205A43Aトロンビンキュベットには FVIII の方がフィブリノゲンより 多くの結合が確認された。 24E205A43Aは高い FVIII 特異性を有している事が確認された。

[0142]

(3) 205A43Aトロンビン及び24E205A43Aトロンビンのトロンボモジュリン親和性の比較 205A43Aトロンビン及び24E205A43Aトロンビン固定化キュベットに対し16.7nM ついで50n Mのトロンボモジュリンを加えた。

結合曲線を図19に示す。尚 205A43Aトロンビンは約980arc, 24E205A43Aトロンビンは約1380arcのトロンビン誘導体が固定化されている。

以上の結果より24E205A43Aトロンビンはフィブリノゲンに対しFVIII特異性が高い誘導体でありAPTT延長効果も有していた。さらにはトロンボモジュリン結合能も大きく低下していることより生態に投与した際、本トロンビン変異体が生体内でのトロンビンによるプロティン(活性化を抑制(阻害)することは無いと考えられる。

[0143]

実験例20

205セリンをアラニンに99アスパラギン酸をアラニンに置換したトロンビン (205A99Aトロンビン) の発現

205A99AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205A99Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号41に示す。

205A99A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法にエカリンによる活性化を行ったところ、エカリンによるA、B鎖への切断が起こらなかった

この結果より205A99Aトロンビンをプレトロンビンの形でCHO細胞にて発現した本実験においては2本鎖に活性化された205A99Aトロンビンを得ることはできなかった。

$[0\ 1\ 4\ 4\]$

[実験例21]

カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビン及びカルボキシル基修飾203A205Gトロンビン、205A43AトロンビンのAPTTの比較

PBSに溶解した 50μ g/mlのカルボキシル基修飾アンヒドロトロンビン、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン、205A43Aトロンビンを以下の2方法でAPTTを測定した。コントロールとしてPBSのみを添加して下記方法a, bにてAPTTを測定した。尚 カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンは残存活性の影響を極力防ぐために合成後、再度APMSF試薬(シグマ社)を2 mg/ml添加し不活性化を行い、さらにその後PBSにて十分透析を行い残存APMSF試薬の除去を行った。

[0145]

方法 b :標準血漿 $1 \ 0 \ 0 \ \mu \ 1$ PBSに溶解した各サンプル $1 \ 0 \ 0 \ \mu \ 1$ 及びAPTT試薬 $5 \ 0 \ \mu \ 1$ を加え $3 \ 7$ で 5 分インキュベーションを行った後 $0 \ \cdot \ 1$ M $0 \ a \ 0 \ 1$ を $1 \ 2 \ \mu \ 1$ 加えカルシウム添加から凝固までの時間を測定した。

[0146]

結果を以下に示す。

コントロール方法 a 43秒; 方法 b 45秒カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビン方法 a 105秒; 方法 b 66秒カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン方法 a 75秒; 方法 b 80秒205A43Aトロンビン方法 a 67秒; 方法 b 77秒

カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン 方法a 145秒; 方法b 170秒

$[0 \ 1 \ 4 \ 7]$

以上より、カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンにおいては方法aにて良くAPTTを延長したのに対しカルボキシル基修飾203A205Gトロンビン、205A43Aトロンビンにおいては方法bにて良くAPTTが延長された。またカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンは205A43Aトロンビンよりも同一条件においてAPTT延長効果は高かった。

方法 a は標準血漿と各トロンビン誘導体混合物のインキュベーション時間が無いのに対し方法 b は標準血漿と各トロンビン誘導体混合物が3.7 $\mathbb C$ で5 分インキュベーションされる。カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンにおいて方法 b でAPTT延長効果が少なくなった理由としてアンヒドロトロンビンから化学的に合成されるアンヒドロトロンビンにおいて極微量に残存するトロンビンの存在を完全に否定できず極わずかなトロンビンが標準血漿と3.7 $\mathbb C$ インキュベーションすることで微量の血液凝固因子(特にFVIII)活性化が起き、APTT延長効果を抑制したものと考えられた。一方、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン、205A43Aトロンビンにおいては遺伝子組み換え技術によって完全に活性を失っているトロンビン誘導体であり、標準血漿とインキュベーションした場合においても血液凝固因子の活性化は起きず、むしろインキュベーションを行った場合の方が平衡化され基質特異性が良く反映され顕著にAPTTを延長した。

以上の考察より、抗血栓剤としてトロンビン誘導体及びそのカルボキシル基修飾誘導体を用いる場合には極微量のトロンビンの混入が考えられるアンヒドロトロンビンを用いるよりも、遺伝子工学的に完全に不活性化され且つ均一な組み換え誘導体から選ばれる適切な薬効を有した本発明で得られる遺伝子組み換えトロンビン及びそのカルボキシキル基修飾誘導体の方が安全であり、かつ37℃で少なくとも数時間は存在するvivoでは薬効も高いことが予想される事が示された。

[0148]

実験例22

(1)B鎖77リシンをアラニンに205セリンをアラニンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン(77A205A43Aトロンビン)の発現

77A205A43A トロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。77A205A43A トロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号43に示す。

77A205A43A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された77A205A43A トロンビンが約3mg得られた。

$[0 \ 1 \ 4 \ 9]$

(2) 77A205A43A トロンビン 50μ g及び 25μ gを、PBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは45秒であったのに対し、77A205A43AトロンビンのAPTTはそれぞれ90.5秒、85秒であった。

[0150]

(3)カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、lmg/5mlo 77A205A43Aトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5) を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4Cで3時間透析した後 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬)を、その濃度が<math>20mg/mlになるように添加し、25 Cにて1 時間インキュベーションし、77A205A43A トロンビンのカルボキシル基を修飾した。可溶化状態で約85%の修飾体が回収された。

カルボキシル基修飾 77A205A43A トロンビン 50μ g及び 25μ g を、PBS 1 m 1 に溶解した溶液 100μ 1 を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で 1 : 1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に 1 : 1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは 45 秒であったのに対し、カルボキシル基修飾 77A205A43A トロンビンの APTT は 77A205A43A トロンビンの 15A205A43A トロンビンの 15A205A43A トロンビ

[0 1 5 1]

(4)プロトロンビン時間(PT)の測定

77A205A43Aトロンビン及びカルボキシル基修飾77A205A43Aトロンビン 50μ gを、PBS1m1に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)にそれぞれ容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHR OMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは23秒であったのに対し77A205A43Aトロンビンは24秒、カルボキシル基修飾77A205A43AトロンビンのPTは25秒でありいずれもPTの延長効果は示さなかった。

以上の結果よりB鎖77リシンをアラニンに置換することで置換前に比較しAPTT延長効果が高まった。又、修飾体においても77リジンをアラニンに置換することでAPTT延長効果が増強された。又、B鎖77をグルタミン酸に置換した場合に比べ修飾した場合の回収率の大きな低下は認められなかったことよりB鎖77における修飾の適性はアラニンの方が高

い事が示された。

[0152]

実験例23

(1)B鎖65リシンをアラニンに205セリンをアラニンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン(65A205A43Aトロンビン)の発現

65A205A43A トロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。65A205A43A トロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号45に示す。

65A205A43A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC 末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC 末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された65A205A43A トロンビンが約3mg得られた。

[0153]

(2) 65A205A43A トロンビン 50μ g及び 25μ gを、PBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは42秒であったのに対し、65A205A43AトロンビンのAPTTはそれぞれ93秒、86秒であった。

[0154]

(3)カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、lmg/5mlの65A205A43Aトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5) を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4Cで3時間透析した後 l-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬)を、その濃度が<math>20mg/mlになるように添加し、2.5 ℃にて1 時間インキュベーションし、65A205A43A トロンビンのカルボキシル基を修飾した。

カルボキシル基修飾 65A205A43A トロンビン 50μ g、 25μ gを、PBS 1 m 1 に溶解した溶液 100μ 1 を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で 1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に 1:1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは 41 秒であったのに対し、カルボキシル基修飾 65A205A43A トロンビンのAPTTは 7π 0 を 7π 1 を 7π 1 を 7π 1 の 7π 1 を 7π 1 に溶解した。

[0155]

(4)プロトロンビン時間(PT)の測定

65A205A43Aトロンビン及びカルボキシル基修飾65A205A43Aトロンビン 50μ gを、PBS1 m 1 に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)にそれぞれ容量比で1:1 の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 (容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHR OMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは23秒であったのに対し65A205A43Aトロンビンは22秒、カルボキシル基修飾65A205A43AトロンビンのPTは25秒でありいずれもPTの延長効果は殆ど示さなかった。

[0156]

(5) PRPを用いた65A205A43Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価 1 : 採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2800rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。 100μ 15 15 100 15 100 15 100 15 100 15 100 15 100 15 100 15 100 15 100 15 100 15 100 15 100 15 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 10

[0157]

評価 2 : 惹起物質として 1μ g /ml カルボキシル基修飾トロンビン PBS 溶液を用い 65A205A43 Aトロンビンの終濃度が、 100, 50, 25, 10μ g /m 1 になるように添加した以外は、評価 1 の方法に準じて実験を行った。 コントロールとして、 PRP 130μ 1 に、 PBS 100μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。 結果を図 29、 30、 31 に示す。

評価3:惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液を用い100 μ l 添加した場合に修飾65A205A43Aトロンビンの終濃度が、それぞれ $36,18,9,4.5\mu$ g/ml になるように濃度が調製された、修飾65A205A43AトロンビンのPBS溶液を加え、評価1の方法に準じて実験を行った。結果を図 32、33、34に示す。

評価 4 :修飾 65A205A43Aトロンビンの終濃度が、 36μ g / m 1 になるように濃度が調製された、修飾 65A205A43Aトロンビンの PBS 溶液を、 100μ 1 ずつ PRP1 30μ 1 に添加し、惹起物質として 5 m g / m 1 リストセチン PBS 溶液 35μ 1 を添加した。コントロールとして、PRP1 30μ 1 に、PBS 100μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図 35 に示す・

[0158]

以上の結果より65A205A43Aは205A43Aに比較して高いAPTT延長効果を有し且つより低濃度で強い修飾トロンビン惹起血小板凝集抑制効果を示した。

[0159]

(6) 65A205A43Aトロンビン及び205A43Aトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合 特異性の比較

65A205A43Aトロンビン誘導体及び205A43Aトロンビンの約0.1mg/mlの濃度の10mM リン酸緩衝液(pH7.7)溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25 $\mathbb C$ で撹拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS 活性化CMデキストランキュベットに固定し、65A205A43Aトロンビン固定化キュベットを得た。(約1800 ar c結合)引き続き 1 M エタノールアミン(pH8)を0.2ml 加えブロッキング処理を行った。65A205A43Aキュベットに100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図36に示す。図36より205A43Aトロンビンに比較し65A205A43AキュベットではFVIIIの特異性が高くなっている事がが確認された。

$[0\ 1\ 6\ 0\]$

(7) 205A43Aトロンビン及び65A205A43Aトロンビンのトロンボモジュリン親和性の比較 65A205A43Aトロンビン固定化キュベットに対し16.7nM、ついで50nMのトロンボモジュリンを加えた。

結合曲線を図37に示す。尚、65A205A43Aトロンビンは約1800arc固定化されている。

以上の結果より図19記載の205A43Aトロンビンのトロンボモジュリン結合能と比較した場合、固定化蛋白量の相対的な比率で換算すると65A205A43Aは約30%にトロンボモジュリン結合能が低下していた。トロンボモジュリン結合能が低下していることより生態に投与した際、65A205A43Aトロンビン変異体が生体内でのトロンビンによるプロテイン(活性化の抑制(阻害)が低下していると考えられる。

【産業上の利用可能性】

$[0\ 1\ 6\ 1]$

本発明のトロンビン誘導体は、抗血栓剤、抗炎症剤などの医薬として好適に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

[0162]

【図1】 5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン($37 \mu\text{ g/ml}$)の抗血小板効果を示す図。009がコントロールを、010がカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンを示す。縦軸が透過率(%)、横軸が時間(分)を示す(図2-12、15,21-22、25-35も同じ)。

【図2】 1μ g/m1カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン(37μ g/m1)の抗血小板効果を示す

- 図。002がコントロールを、001がカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンを示す。
- 【図3】 5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、205A43Aトロンビン($30 \mu \text{ g/ml}$)の抗血小板効果を示す図。079がコントロールを、080が205A43Aトロンビンを示す。
- 【図4】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、205A43Aトロンビン(30μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。083がコントロールを、084が205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 5 】 5 m g/m 1 リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン(30 μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。056がコントロールを、055がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 6 】 5 m g/m l リストセチンで血小板凝集を惹起したP R P に対する、カルボキシル基修飾205 A43 Aトロンビン($15 \mu \text{ g/m l}$)の抗血小板効果を示す図。042 がコントロールを、041 がカルボキシル基修飾205 A43 Aトロンビンを示す。
- 【図7】 5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン($7.5 \mu \text{ g/ml}$)の抗血小板効果を示す図。058がコントロールを、057がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 8 】 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾 205A43Aトロンビン(30 μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。064がコントロールを、063がカルボキシル基修飾 205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 9】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、カルボキシル基修飾 205 A 43 A トロンビン(15μ g/m 1)の抗血小板効果を示す図。067 がコントロールを、066 がカルボキシル基修飾 205 A 43 A トロンビンを示す。
- 【図10】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾 205A43Aトロンビン(7.5μ g/m 1)の抗血小板効果を示す図。070がコントロールを、069がカルボキシル基修飾 205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 1 1】 5 mg/m l リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、203A2 05Gトロンビン(80 μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。104がコントロールを、095が2 03A205Gトロンビンを示す。
- 【図 1 2 1 μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、203A205Gトロンビン(80 μ g/m1)の抗血小板効果を示す図。097がコントロールを、098が203A205Gトロンビンを示す。
- 【図 1 3 】 203A205Gトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が 1.0×10^{-7} Mのフィブリノゲン、実線が 1.0×10^{-7} MのFVIIIを示す。
- 【図 1 5 】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、205A43Aトロンビン(007; 3.26μ M、008; 0.81μ M)の抗血小板効果を示す図。009がコントロールを示す。
- 【図 1 6 】 205A43Aトロンビン誘導体のフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が 1.0×10^{-7} Mのフィブリノゲン、実線が 1.0×10^{-7} MのFVIIIを示す。
- 【図 1 7】 205A43Sトロンビン誘導体のフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が $1.0 \times 10^{-7} M$ のフィブリノゲン、実線が $1.0 \times 10^{-7} M$ のFVIIIを示す。
- 【図 1 8 】 24E205A43Aトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が1.0× 10^{-7} Mのフィブリノゲン、実線が1.0× 10^{-7} MのFVIIIを示す。
- 【図 1 9】 205A43Aトロンビン及び24E205A43Aトロンビンのトロンボモジュリン親和性を示す図。Dが205A43Aトロンビン、Eが24E205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 2 0 】 203Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を示す電気泳動の図(写真)。 1 は分子量マーカー、 2 , 5 は空のレーン、 3 はFXIIIのみ、 4 はFXIII+ 203Aトロンビンを示す。また、レーン 6 ~ 1 0 はFXIIIに 203Aトロンビンを加えてそれぞれ0, 0. 5 , 1 , 3 , 6 時間反応させたものを示す。

- 【図 2 1】 μ g/m l カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した PRPに対する、カルボキシル基修飾 205Aトロンビン(100 μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。 016 がコントロールを、015 が 203A 205 Gトロンビンを示す。
- 【図 2 2 】 5 m g/m l リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾205Aトロンビン($100 \mu \text{ g/m l}$)の抗血小板効果を示す図。003がコントロールを、004がカルボキシル基修飾205Aトロンビンを示す。
- 【図 2 3 】 205Aトロンビン誘導体のフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が $I.0 \times I0^{-7}$ Mのフィブリノゲン、実線が $I.0 \times I0^{-7}$ MのFVIIIを示す。
- 【図 2 4 】 205A203Aトロンビン誘導体のフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が 1.0×10^{-7} Mのフィブリノゲン、実線が 1.0×10^{-7} MのFVIIIを示す。
- 【図 2 5 】 5 m g/m l リストセチンで血小板凝集を惹起した PRP に対する、カルボキシル基修飾 77E203A205Gトロンビン($50 \mu \text{ g/m l}$)の抗血小板効果を示す図。001がコントロールを、002がカルボキシル基修飾 77E203A205Gトロンビンを示す。
- 【図 2 6 】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した PRPに対する、カルボキシル基修飾 77E203A205Gトロンビン(50μ g/m 1)の抗血小板効果を示す図。014がコントロールを、013がカルボキシル基修飾 77E203A205Gトロンビンを示す。
- 【図 2 7】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、77E205A43Aトロンビン(100μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。019がコントロールを、020が77E205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 2 8 】 5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾 77E205A43Aトロンビン($30 \mu \text{ g/ml}$)の抗血小板効果を示す図。005 mg コントロールを、006 mg カルボキシル基修飾 77E205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 2 9】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、65A205A43Aトロンビン(100μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。020がコントロールを、019が65A205A43Aトロンビンを示す。
- 【図30】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、65A205A43Aトロンビン(25または 50μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。021が 25μ g/mlを、022が 50μ g/mlを示す。
- 【図31】 1μ g/m1カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、65A205A43Aトロンビン(10μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。023がコントロールを、024が65A205A43Aを示す。
- 【図32】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾 65A205A43Aトロンビン(36μ g/m 1)の抗血小板効果を示す図。038がコントロールを、033がカルボキシル基修飾 65A205A43Aトロンビンを示す。
- 【図33】 l_{μ} g/m l カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾65A205A43Aトロンビン(g又は $l8_{\mu}$ g/ml)の抗血小板効果を示す図。035 $m18_{\mu}$ g/ml を、036 $m9_{\mu}$ g/ml を示す。
- 【図34】 l_{μ} g/m l カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した PRPに対する、カルボキシル基修飾 65A205A43Aトロンビン(4.5_{μ} g/m l)の抗血小板効果を示す図。
- 【図35】5 m g/m l リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾65A205A43Aトロンビン(36 μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。041がコントロールを、042がカルボキシル基修飾77E205A43Aトロンビンを示す。
- 【図36】65A205A43Aトロンビン誘導体のフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線 $m1.0 \times 10^{-7} M$ のフィブリノゲン、実線 $m1.0 \times 10^{-7} M$ のFVIIIを示す。
- 【図37】65A205A43Aトロンビンのトロンボモジュリン親和性を示す図。

SEQUENCE LISTING

```
<110> Chisso Corporation
       FUJIMORI KOGYO Co., Ltd.
〈120〉 トロンビン誘導体、およびそれを含有する医薬組成物
\langle 130 \rangle P - C 5 0 0 3 7
<150> JP 2004-080950
<151> 2004-03-19
<150> JP 2004-170346
< 1 5 1 > 2 0 0 4 - 0 6 - 0 8
<150> JP 2004-217834
<151> 2004-07-26
<150> JP 2004-315631
\langle 151 \rangle 2004-10-29
\langle 160 \rangle 46
<170> PatentIn version 3.1
< 2 1 0 > 1
<211> 927
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
<222> (1).. (927)
< 2 2 3 >
< 4 0 0 > 1
acc gcc acc agt gag tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc
Thr Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly
                5
                                     1.0
tcg gga gag gca gac tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg
                                                                          96
Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser
            2 0
                                  2.5
                                                       3 0
ctg gag gac aaa acc gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg
                                                                         144
Leu Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr lle Asp Gly
        3 5
                                                  4.5
                             4 0
cgc att gtg gag ggc tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag
                                                                         192
Arg Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln
                         55
                                              60
gtg atg ctt ttc cgg aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc
                                                                         2 4 0
```

V a 1	Met	Leu	P h e	Arg	L y s 7 0	Ser	Pro	Gln	Glu	L e u 7 5	L e u	Суѕ	Gly	Ala	S e r 8 0	
	a t c	a g t	gac	СВС	t g g	gtc	ctc	асс	gcc	gcc	сас	t g c	ctc	ctg		288
Leu											His					
			•	85	•				9 0			Ť		9 5	·	
ссв	ССС	tgg	gac		аас	ttc	асс	gag		gac	ctt	ctg	gtg	СВС	a t t	3 3 6
											Leu					
			100	- , -				105					110			
ggc	aag	сас	t c c	С g С	аса	agg	t a c	gag	сва	аас	a t t	gaa	aag	a t a	t c c	384
Gly	Lys	His	Ser	Arg	Thr	Arg	Туr	Glu	Arg	Asn	I I e	Glu	Lys	Пlе	Ser	
		115					120					1 2 5				
a t g	ttg	gaa	aag	a t c	t a c	a t c	сас	ССС	agg	t a c	аас	t g g	сдд	gag	аас	4 3 2
Met	Leu										Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	
	130					135					1 4 0					
ctg	gac	Сдд	g a c	a t t	gcc	ctg	a t g	aag	ctg	aag	aag	c c t	g t t	gcc	t t c	480
Leu	Asp	Arg	Asp	Пe	Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	
145					150					155					160	
a g t	gac	t a c	a t t	сас	c c t	gtg	t g t	ctg	ССС	gac	agg	gag	асв	gca	gcc	5 2 8
											Arg				Ala	
				165					170					175		
agc	ttg	ctc	cag	gct	gga	t a c	aag	ggg	Сдд	gtg	аса	ggc	t g g	ggc	аас	5 7 6
											Thr			Gly	Asn	
			180				•	185					190			
ctg	aag	gag	асв	t g g	аса	gcc	аас	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ССС	a g t	gtc	6 2 4
Leu	Lys	Glu									Gly	Gln	Pro	Ser	Val	
		195					200					205				
ctg	cag	gtg	g t g	аас	ctg	ссс	a t t	gtg	gag	Сдд	ССВ	g t c	t g c	aag	gac	672
Leu	Gln	Val	Val	Asn	Leu	Pro	Пе	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Суѕ	Lуs	Asp	
	210					2 1 5					2 2 0					
t c c	асс	Сдд	a t c	С g С	a t c	a c t	gac	аас	a t g	t t c	t g t	g c t	g g t	t a c	aag	7 2 0
											Суs					
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0	
$c\ c\ t$	gat	gaa	ggg	a a a	сва	ggg	gat	g c c	t g t	gaa	g g t	gac	a g t	ggg	gga	768
Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	Arg	Gly	Asp	Ala	Суѕ	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	
				2 4 5					250					255		
ССС	t t t	g t c	a t g	aag	a g c	ссс	t t t	аас	аас	С g С	t g g	t a t	саа	a t g	ggC	8 1 6
Pro	Phe	Val	Met	Lys	Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Туr	Gln	Met	Gly	
			260					265					270			
a t c	gtc	$t\ c\ a$	t g g	ggt	gaa	g g C	t g t	gac	сдд	g a t	ggg	a a a	t a t	ggc	t t c	8 6 4
Пе	Val	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Суѕ	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Туr	Gly	Phe	
		275					280					285				
t a c	аса	cat	gtg	t t c	С g С	ctg	a a g	aag	t g g	a t a	сав	aag	gtc	a t t	g a t	9 1 2
Туr	Thr	His	V a l	P h e	Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	lle	Gln	Lys	Val	Ιlе	Asp	
	290					295					300					
сав	t t t	gga	gag	t a g												9 2 7
Gln	Phe	Gly	Glu													
305																

```
< 4 0 0 >
Thr Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly
                5
                                     1 0
Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser
                                 25
Leu Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly
        35
                             4 0
                                                 45
Arg Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln
                         5.5
Val Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser
65
                    7.0
                                         75
                                                              8 0
Leu Ile Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr
                8.5
                                     90
Pro Pro Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile
                            105
            100
                                                     1 1 0
Gly Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser
        1 1 5
                            1 2 0
                                                125
Met Leu Glu Lys Ile Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn
                        135
Leu Asp Arg Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe
     1 5 0
                                        155
Ser Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala
                165
                                    170
Ser Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn
            180
                                 185
                                                     190
Leu Lys Glu Thr Trp Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val
                             200
        195
                                                  205
Leu Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp
                         2 1 5
    2 1 0
                                             2 2 0
Ser Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys
                    2 3 0
                                         235
Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly
                2 4 5
                                     250
                                                          255
Pro Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly
            260
                                 265
lle Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe
        275
                            280
                                                285
Tyr Thr His Val Phe Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp
                        295
                                             300
Gln Phe Gly Glu
305
< 2 1 0 >
< 2 1 1 >
      1 0
<212>
      PRT
```

<212>

< 2 1 3 >

<213>

Homo sapiens

PRT

Homo sapiens

```
< 4 0 0 > 3
Gly Asp Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu
                 5
< 2 1 0 > 4
\langle 211 \rangle 73
\langle 2 1 2 \rangle PRT
<213> Homo sapiens
< 4 0 0 > 4
Arg Arg Pro Glu Ser Lys Ala Thr Asn Ala Thr Leu Asp Pro Arg Ser
Phe Leu Leu Arg Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp
             20
                                  25
                                                        3 0
Glu Glu Lys Asn Glu Ser Gly Leu Thr Glu Tyr Arg Leu Val Ser Ile
                              4 ()
Asn Lys Ser Ser Pro Leu Gln Lys Gln Leu Pro Ala Phe Ile Ser Glu
    5 0
                         55
                                               6.0
Asp Ala Ser Gly Tyr Leu Thr Ser Ser
65
                     7.0
<210> 5
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
      CDS
< 2 2 1 >
< 2 2 2 >
      (1)...(1056)
<223>
< 4 0 0 >
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                           4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                 5
                                      1 0
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                           96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
             2 0
                                  25
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                          1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                              4 0
                                                   4 5
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                          192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                        5 5
                                               6 0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                          2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                     7 0
                                           75
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                          288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
```

				8 5					9 0					9 5		
t c g	gat	gca	gag		ggc	atg	t c a	cct		сав	gtg	a t g	ctt		Сдд	3 3 6
							Ser									
			100					105					1 1 0			
a a g	a g t	$C \; C \; C$	сав	gag	$c\ t\ g$	$\mathfrak{c} \ \mathfrak{t} \ \mathfrak{g}$	t g t	ggg	gcc	a g c	$c\;t\;c$	a t c	a g t	gac	c g c	3 8 4
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Сус	Gly	Ala	Ser	Leu	Пе	Ser	Asp	Arg	
		115					1 2 0					1 2 5				
							t g c									4 3 2
Trp		Leu	Thr	Ala	Ala		Суѕ	Leu	Leu	Tyr		Pro	Trp	Asp	Lуs	
	130			4		135	. 4			. 4 4	1 4 0			1		4 O A
							ctg									4 8 0
145	1 11 6	1 11 1	GIU	W 2 II	150	Leu	Leu	v a I	AIg	155	GIJ	Г } 3	11 1 2	261	160	
	agg	tac	gag	C g a		a t t	gaa	ааσ	a t a		a t ø	t t g	gaa	aag		5 2 8
							Glu									0 2 0
	0	- • -		165				-,-	170					175		
t a c	a t c	сас	ссс	agg	t a c	аас	t g g	Сдд	gag	аас	c t g	gac	Сдд	gac	a t t	5 7 6
Туr	Пlе	His	Pro	Arg	Туr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	I 1 e	
			180					185					190			
gcc	c t g	a t g	a a g	$c\;t\;g$	a a g	a a g	$c\ c\ t$	g t t	gcc	t t c	a g t	g a c	t a c	a t t	сас	6 2 4
Ala	Leu		Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser		Tyr	Пe	His	
		195					200					2 0 5				4.5.0
							gag									6 7 2
Pro		Cys	Leu	Pro	Asp		Glu	I n r	Ala	Ala		Leu	Leu	GIN	Ala	
gga	210	2 2 11		c a a	ata	215	ggC	t a a	a a c	226	2 2 0	220	חבח	2 C U	t a a	7 2 0
							G I y									1 2 0
2 2 5	1 , 1	Цз	01,	11 1 6	2 3 0	1 11 1	01)	11 p	01)	235	Lvu	Цјз	oru	1 11 1	2 4 0	
	gcc	аас	gtt	g g t		ggg	сав	ссс	a g t		ctg	сав	gtg	gtg	аас	768
							Gln								Asn	
				2 4 5					250					255		
\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{g}	$C \; C \; C$	a t t	gtg	gag	Сдд	ССВ	g t c	$t \ g \ c$	a a g	gac	$t\ c\ c$	асс	Сдд	a t c	c g c	8 1 6
Leu	Pro	Пlе		Glu	Arg	Pro	V a l	Суѕ	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Пlе	Arg	
			260					265					270			
							gct									8 6 4
He	lhr		Asn	Met	Phe	Суѕ	Ala	GIy	lyr	Lys	Pro		Glu	GIy	Lуs	
0 0 0		275	a c c	+ a +	« o o	a a t	280	o a t			0.0.0	285	a t c	a t a	0 0 0	0 1 2
							gac Asp									9 1 2
ЛІБ	290	лэр	лια	0 3 3	Glu	295	дзр	N C I	GIJ	UI,	300	1 11 6	v a i	IATCT	Гјз	
agc		t t t	аас	аас	C g C		t a t	саа	atg	ggc		gtc	t c a	t g g	g g t	960
							Туг									
3 0 5					3 1 0	•	•			3 1 5					3 2 0	
g a a	g g c	t g t	g a c	свв	g a t	ggg	a a a	t a t	g g C	t t c	t a c	аса	c a t	g t g	t t c	1008
Glu	Gly	Суѕ	Asp	Arg	$A\ s\ p$	Gly	Lys	Туr	Gly	P h e	Tyr	Thr	His	Val	P h e	
				3 2 5					3 3 0					3 3 5		
							a a g								t a g	1 0 5 6
Arg	Leu	Lуs		Trp	lle	Gln	Lуs		lle	Asp	Gln	Phe		Glu		
			3 4 0					3 4 5					350			

< 2 1 3 > Homo sapiens < 4 0 0 > 6 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln 20 25 3 0 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu 4 0 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp 50 5 5 6 0 Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr 70 75 Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly 8 5 90 Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg 100 105 Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg 115 1 2 0 Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys 135 1 4 0 Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg 150 155 Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile 170 165 Tyr lle His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp lle 185 Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr lle His 195 200 205 Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala 2 1 5 2 2 0 Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp 2 2 5 2 3 0 235 Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn 250 2 4 5 Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg 270 260 265 lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys 280 285 Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys 295 290 300 Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly 305 3 1 0 3 1 5 Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe 3 2 5 3 3 0 Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu

3 4 5

350

<210><211>

< 2 1 2 >

351

3 4 0

PRT

```
\langle 2 1 0 \rangle = 7
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
< 2 2 2 >
      (1)...(1056)
< 2 2 3 >
<400> 7
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                      4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                   1 0
                                                                       96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                                25
            20
                                                    3 0
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                      1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
        35
                            4 0
                                                4.5
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                      192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    5.0
                        55
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                      2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
    7 0
                        7 5
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                      288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr lle Asp Gly Arg lle Val Glu Gly
                8.5
                                    90
                                                                      3 3 6
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
                                                    110
                            105
          100
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
                                                                      384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu lle Ser Asp Arg
        1 1 5
                            1 2 0
                                                1 2 5
tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag
                                                                      4 3 2
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
    130
                        135
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc
                                                                      480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                         155
        150
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc
                                                                      528
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                             170
               165
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att
                                                                      5 7 6
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
                                185
            180
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac
                                                                      624
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
```

195			200		2 0 5			
	ctg ccc	gac agg		gca gcc		ctc c	ag gct	672
Pro Val Cys								V 1 2
2 1 0		215	V. W		2 2 0			
gga tac aag	ggg Cgg	gtg aca	ggc tgg	ggc aac	ctg aag	gag a	cg tgg	7 2 0
Gly Tyr Lys	Gly Arg	Val Thr	Gly Trp	Gly Asn	Leu Lys	Glu Tl	ar Trp	
2 2 5		2 3 0		2 3 5			2 4 0	
aca gcc aac	gtt ggt	aag ggg	cag ccc	agt gtc	ctg cag	gtg g	tg aac	768
Thr Ala Asn	Val Gly	Lys Gly	Gln Pro	Ser Val	Leu Gln	Val Va	al Asn	
	2 4 5			2 5 0		2 5	5 5	
ctg ccc att	gtg gag	cgg ccg	gtc tgc	aag gac	tcc acc	cgg a	tc cgc	8 1 6
Leu Pro Ile	Val Glu	Arg Pro	Val Cys	Lys Asp	Ser Thr	Arg I	le Arg	
	260		265			270		
atc act gac	aac atg	ttc tgt	gct ggt	tac aag	cct gat	gaa g	gg aaa	864
lle Thr Asp	Asn Met	Phe Cys	Ala Gly	Tyr Lys	Pro Asp	Glu G	ly Lys	
2 7 5			280		285			
cga ggg gat						g t c a		9 1 2
	Ala Cys	Glu Ala	Asp Gly	Gly Gly		Val Me	et Lys	
2 9 0		2 9 5			3 0 0			
		cgc tgg				t cat {		960
	Asn Asn	Arg Trp	Tyr Gln		Ile Val	Ser Ti		
3 0 5		3 1 0		3 1 5		,	3 2 0	1 0 0 0
		gat ggg					-	1008
Glu Gly Cys		Asp Gly	Lys lyr		lyr Ihr			
	3 2 5			3 3 0		3 3		1 0 5 6
cgc ctg aag						gga ga	-	1056
Arg Leu Lys		rre Grn		rre Asp	GIN FNE		I U	
	3 4 0		3 4 5			3 5 0		
< 2 1 0 > 8								
<211> 351								
<212> PRT								
	sapiens							
	s a p i e n s							
	sapiens							
< 2 1 3 > Homo		Gly Leu	Gln Leu	Pro Gly	Cys Leu	Ala Le	eu Ala	
<213> Homo <400> 8		Gly Leu	Gln Leu	Pro Gly 10	Cys Leu	Ala Le		
<213> Homo <400> 8 Met Ala His	Val Arg			1 0		1 ()	
<213> Homo <400> 8 Met Ala His	Val Arg			1 0		1 ()	
<pre><213> Homo <400> 8 Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	Val Arg 5 Ser Leu 20	Val His	Ser Gln 25 Arg Val	10 His Val	Phe Leu	1 S A I a P i 3 O	ro Gln	
<pre><213> Homo <400> 8 Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35</pre>	Val Arg 5 Ser Leu 20 Ser Leu	Val His Leu Gln	Ser Gln 25 Arg Val	10 His Val Arg Arg	Phe Leu Thr Ala 45	Ala Pi 30 Thr Se	oro Gln er Glu	
<pre><213> Homo <400> 8 Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr</pre>	Val Arg 5 Ser Leu 20 Ser Leu	Val His Leu Gln Asn Pro	Ser Gln 25 Arg Val	10 His Val Arg Arg	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly	Ala Pi 30 Thr Se	oro Gln er Glu	
<pre><213> Homo <400> 8 Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50</pre>	Val Arg 5 Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe	Val His Leu Gln Asn Pro	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr	10 His Val Arg Arg Phe Gly	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60	Ala Pi 30 Thr So	ro Gln er Glu la Asp	
<pre><213> Homo <400> 8 Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	Val Arg 5 Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr	10 His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60	Ala Pi 30 Thr So	oro Gln er Glu la Asp ys Thr	
<pre><213> Homo <400> 8 Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	Val Arg 5 Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr	10 His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser 75	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60 Leu Glu	Ala Pi 30 Thr Se Glu A	ro Gln er Glu la Asp ys Thr 80	
<pre><213> Homo <400> 8 Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	Val Arg 5 Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr	10 His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser 75 Asp Gly	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60 Leu Glu	Ala Pi 30 Thr Se Glu As Asp Ls	ro Gln er Glu la Asp ys Thr 80 lu Gly	
<pre><213> Homo <400> 8 Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu</pre>	Val Arg 5 Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Leu 85	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr Glu Lys Tyr Ile	10 His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser 75 Asp Gly 90	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60 Leu Glu Arg Ile	Ala Pi 30 Thr Sc Glu A Asp Ly Val G	ro Gln er Glu la Asp ys Thr 80 lu Gly	
<pre><213> Homo <400> 8 Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	Val Arg 5 Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Leu 85 Glu Ile	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr Glu Lys Tyr Ile Ser Pro	10 His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser 75 Asp Gly 90	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60 Leu Glu Arg Ile	Ala Pi 30 Thr Se Glu As Asp Ls Val G	ro Gln er Glu la Asp ys Thr 80 lu Gly	
<pre><213> Homo <400> 8 Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu</pre>	Val Arg 5 Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Leu 85 Glu Ile	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser Gly Met	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr Glu Lys Tyr Ile Ser Pro 105	10 His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser 75 Asp Gly 90 Trp Gln	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60 Leu Glu Arg Ile Val Met	Ala Pi 30 Thr Sc Glu A Asp Ly Val G 95 Leu Pi	ro Gln er Glu la Asp ys Thr 80 lu Gly ne Arg	

```
1 2 0
                                                 1 2 5
        1 1 5
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                        1 3 5
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                    150
                                        155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                    170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
           180
                                                     190
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
       195
                            200
                                                205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                        2 1 5
                                             2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                    2 3 0
                                        235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                     250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
                                 265
            260
                                                     270
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        275
                            280
                                                 285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Gly Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                        295
                                             300
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                    3 1 0
305
                                       3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                3 2 5
                                   3 3 0
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                 3 4 5
                                                     350
< 2 1 0 > 9
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
      CDS
< 2 2 2 >
      (1)...(1056)
< 2 2 3 >
< 4 0 0 > 9
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                       48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                     1 0
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                        96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            20
                                 25
                                                     3.0
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                       1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
        35
                             4 0
                                                 45
```

t a c	сав	a c t	ttc	ttc	aat	c c o	200	200	t t t	σσε	tcσ	σσα	σασ	o c a	gac	192
	Gln															1 3 2
	5 0					5 5				•	6 0	•				
t g t	ggg	c t g	сва	$c\ c\ t$	c t g	t t c	gag	aag	aag	tcg	c t g	gag	gac	a a a	асс	2 4 0
	Gly	Leu	Arg	Pro		Phe	Glu	Lys	Lys		Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
6 5					70					75					8 0	0.00
	aga															2 8 8
GIU	Arg	6 I U	Leu	Leu 85	6 I U	5 e r	ıyr	1 1 e	A S D 9 0	6 I Y	Arg	1 1 e	v a i	6 I U 9 5	GIY	
t c g	gat	g c a	ggg		ggc	a t ø	t c a	cct		cag	gtg	a t ø	ctt		Caa	3 3 6
	Asp															0 0 0
			100					105					110			
a a g	a g t	c c c	сав	gag	ctg	ctg	t g t	ggg	gcc	a g c	$c\ t\ c$	a t c	a g t	g a c	c g c	3 8 4
Lуs	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Суѕ	Gly	Ala	Ser	Leu	Ilе	Ser	Asp	Arg	
		1 1 5					1 2 0					1 2 5				
	gtc															4 3 2
IГр	V a l 1 3 0	Leu	11111	Ala	Ala	HIS 135	Cys	Leu	Leu	IУГ	140	110	IГр	ASP	Lys	
аас	ttc	асс	gag	aat	gar		ctg	gtg	C g C	att		aag	cac	tcc	cgc	480
	Phe															1 🗸 🗸
145					150					155	·	·			160	
аса	agg	t a c	gag	сва	аас	a t t	g a a	a a g	a t a	$t\ c\ c$	a t g	t t g	gaa	a a g	a t c	5 2 8
Thr	Arg	Туr	Glu		Asn	Пlе	Glu	Lys	Пlе	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ilе	
				165					170					175		5.5.0
	atc															5 7 6
ΙΥΓ	I l e	ніѕ	180	Arg	lyr	ASII	irp	Arg 185	GIU	ASII	Leu	ASP	Arg 190	ASP	116	
gcc	ctg	atg		ctg	aag	aag	c c t		gcc	t t c	agt	gac		a t t	сас	6 2 4
	Leu															V 2 .
		195					200					205				
$c\ c\ t$	g t g	t g t	$\mathfrak{c} \ \mathfrak{t} \ \mathfrak{g}$	$C \; C \; C$	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	a g c	t t g	$c\;t\;c$	c a g	$\mathfrak{g}\mathfrak{c}\mathfrak{t}$	6 7 2
Pro	V a l	Суѕ	Leu	Pro	Asp		Glu	Thr	Ala	Ala		Leu	Leu	Gln	Ala	
	2 1 0					2 1 5		4			2 2 0				4	5 O A
	t a c T y r															7 2 0
225	1) 1	ГЪЭ	GIY	АГЕ	230	1 11 1	GIJ	110	GIJ	235	Leu	ГЪЭ	GIU	1 11 1	240	
	gcc	аас	gtt	ggt		ggg	сав	ссс	a g t		ctg	сав	gtg	gtg		768
	Ala															
				2 4 5					250					2 5 5		
	$C \; C \; C$															8 1 6
Leu	Pro	lle		Glu	Arg	Pro	Val		Lys	Asp	Ser	Thr		lle	Arg	
a t a	a a t		260	0 + 0	+ + 0	t a t	a o t	265	t o o	0 0 0	0 0 +	a a t	270		0.00	0 2 1
	a c t Thr															8 6 4
110	1 11 1	275	11 2 11	171 (t	1 11 (درې	280	OIJ	. , 1	درں	110	285	oru	oij	ננם	
сва	ggg		gcc	t g t	gaa	g g t		g c t	ggg	gga	ссс		g t c	a t g	aag	9 1 2
	Gly															
	2 9 0					295					3 0 0					
	ССС															9 6 0
Ser	Pro	Рhе	Asn	Asn	Arg	lrp	lyr	GIn	Met	Gly	Пе	v a I	Ser	Irp	GIy	

3 0 5	5							3	1 0							3	15					3 2 0	
		ggc	t	g t	g a	C (gg			g g	g	a a	a	tat	gg (tac	аса	cat	gtg	ttc	1008
																			Thr				
							3 2 5		-			•			3 3 (·			3 3 5		
C g (C (tg	a	a g	a a			a	t a	са	g	a a	g	g t c			a t	сав	t t t	gga		t a g	1056
																			P h e				
	-				3 4							·		3 4 5			-			350			
< 2	10>	>	1 0																				
< 2	11)	>	3 5	l																			
< 2	12>	>	P R	Γ																			
< 2	132	>	Нои	n 0	s a	p i e	e n s																
< 4 (00>	>	1 0																				
Ме	t A	l a	Н	i s	V a	1 /	rg	G	l y	Le	u	Gl	n	Leu	Pro	G	l y	Суs	Leu	Ala	Leu	Ala	
1						Ę)								10						15		
Al	a L	e u	C	y s	Se	r l	e u	V	a l	Нi	S	S e	r	Gln	His	V	a l	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
					2 0									25						3 0			
G 1 1	n A	l a	A	r g	S e	r I	e u	L	e u	Gl	n	A r	g	V a l	Arg	s A	r g	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
			3	5								4 0							4 5				
T y :	r (; l n	T	h r	P h	e F	he	A	s n	Pr	0	A r	g	Thr	Ph€	e G	l y	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	Ĺ	0								5 5								6 0					
C y :	s (; l y	L	e u	Ar.	g F	r 0	L	e u	P h	е	Gl	u	Lys	Lys	S	e r	L e u	Glu	Asp	Lys	Thr	
6 5								7	0							7	5					8 0	
Gli	u A	rg	G	l u	Le	u L	e u	G	lu	S e	r	Ту	r	I 1 e	Asp	G	l y	Arg	Пe	V a l	Glu	Gly	
						{	3 5								90						95		
Se	r A	ls p	A	l a	G1	u l	l e	G	lу	Мe	t	S e	r	Pro	Trp	G	l n	V a l	Met	Leu	Phe	Arg	
					1 0									105						1 1 0			
L y	s S	s e r												Gly	Ala	ı S			Пe	Ser	Asp	Arg	
			1																				
Trı				e u	Th	r A	A I a	A	l a			Сy	S	Leu	Let	ı T	y r		Pro	Trp	Asp	Lys	
		3 0								1 3								1 4 0			_		
		h e	T	n r	G I	u A	sn							Val	Arg			Gly	Lуs	His	Ser		
145						3.			5 0								5 5					160	
Th	r A	rg	T	y r	G I			A	s n	11	е	G I	u	Lys			e r	Met	Leu	Glu		Пе	
T					D		6 5	T				т.			17(175		
Ty	r I	. I e	Н	1 \$			rg	I	y r	A s	n	lr							Asp		Asp	Пе	
. 1	1		1.7	,	18			ī		ī		n		185						190	I 1	11.	
AI	a L	.eu			Lу	s L	.eu	L	УS	Lу				v a i	A I a	l ľ	n e	Ser	Asp	lyr	He	HIS	
D	,	7 . 1		9 5	ī	г	١					2 0		Т 1	4.1.	. 4	1.	C	205	ı	0.1	A 1 -	
r r (y s	L e	u r	r o	A	S D							l A	Ia		Leu	Leu	GIN	Ala	
C 1 .		210			C 1	/		V	. 1	21				Т		. A		2 2 0	I	C 1	ΤЪ	Т., .	
		y r	L	y s	υI	y F	rg			I N	r	ЬI	У	irp	613			Lеи	Lys	6 I U	ınr		
225		. 1 .	A		V.	1 /	. 1		3 0	C 1	_	<u>۱</u>		D	C		35	Ι	C 1	V a 1	V a 1	2 4 0	
I II	[<i>F</i>	A I a	. A	SII	v a			L	λZ	υI	У	υI	11	110			a I	Lеи	Gln	v a i		ASII	
I ^ -	, г	، يا (ı	1 ^	V a		245	A	r "	D -	0	V ^	1	C = -	250		0 r	C ^ =	Ть -	A = ~	255	۸	
геі	u f	1 0	I	ıe			ılU	А	18	rr	0	v a	I		LyS	. А	2 D	o e r	Thr		116	AIB	
[1.	<u>,</u> т	`h =	A	r n	26		10+	D	h ^	ſ	c	Λ 1	0	265	Т.,.	. Т	W C	D	100	270	(1 ···	l v o	
11	c I	ıı f			Λ3.	11 [\	ıcı	ľ	пс	υy				υIJ	ıyſ	L) 2	110	Asp	บเน	υIJ	гуу	
			۷	7 5								28	V						285				

```
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
    290
                         295
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                     3 1 0
                                 3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                 3 2 5
                                      330
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                  3 4 5
                                                       350
< 2 1 0 > 1 1
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
\langle 2 \ 2 \ 2 \rangle (1).. (1056)
< 2 2 3 >
\langle 4 \ 0 \ 0 \rangle 1 1
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                         4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                 5
                                      1 0
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                          96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
             2 0
                                  25
                                                       3.0
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                         1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                             40
                                                   45
        35
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                         192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    5 0
                         55
                                               60
                                                                         2 4 0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag tcg ctg gag gac aaa acc
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
6.5
                     7 0
                                          7.5
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                         288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr lle Asp Gly Arg lle Val Glu Gly
                 85
                                      90
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
                                                                         3 3 6
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            100
                                  105
                                                                         384
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
        115
                             120
                                                   125
tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag
                                                                         4 3 2
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
    1 3 0
                        135
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc
                                                                         480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
1 4 5
                     150
                                          155
                                                                160
```

a c a	agg	t a c	gag	сва	a a c	a t t	gaa	aag	a t a	$t\ c\ c$	a t g	t t g	gaa	aag	a t c	5 2 8
Thr	Arg	Туr	Glu	Arg	Asn	Пlе	Glu	Lys	Пe	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Пе	
				165					170					175		
tac	a t c	сас	c c c		tac	2 2 C	tσσ	coo		220	cto	gar	cσσ	gac	a t t	5 7 6
		His														010
1) 1	116	11 1 2		ЛΙβ	1) 1	W 2 II	ΠP		GIU	A 2 II	Leu	A 2 h		Asp	116	
			180					185					190			
		a t g												a t t		6 2 4
Ala	Leu	Met	Lуs	Leu	Lуs	Lуs	Pro	V a l	Ala	P h e	Ser	Asp	Туr	Пe	His	
		195					200					205				
$c\ c\ t$	gtg	t g t	ctg	c c c	gac	agg	gag	a c g	gca	gcc	a g c	t t g	$c\ t\ c$	cag	g c t	672
		Суѕ										Leu	Leu	Gln	Ala	
	2 1 0	·			•	2 1 5					2 2 0					
c n n		aag		c a a	a t a		a a c	t a a	a a c	226		2 2 0	nrn	2 C G	t a a	720
																1 4 0
	IУГ	Lуs	GIY	Arg		ınr	GIY	irp	GIY		Leu	Lys	GIU	Inr		
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0	
a c a	g C C	a a c	gtt	ggt	a a g	ggg	cag	$C \; C \; C$	a g t	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	аас	768
Thr	Ala	Asn	V a l	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	V a l	Leu	Gln	V a l	V a l	Asn	
				2 4 5					250					255		
ctg	ссс	a t t	gtg	gag	Сдд	ссв	gtc	t g c	aag	gac	t c c	асс	Сдд	a t c	свс	8 1 6
		Ιle												I 1 e		
Lcu	110	110	260	oru	11 1 6	110	,	265	Б, 5	71 5 p	501	1 11 1	270	110	1116	
0 + 0	0.0 +	<i>« • • • • • • • • • • • • • • • • • • •</i>		0 + 4	4 + 0	4 4	a a t		+ 0 0		a a t	a a t				0 6 4
						t g t								ggg		8 6 4
Пе	lhr	Asp	Asn	Met	Phe	C y s		Gly	lyr	Lуs	Pro		6 I u	GIy	Lys	
		2 7 5					280					285				
c g a	ggg	g a t	gcc	t g t	gaa	g g t	gac	a c t	ggg	gga	$c \; c \; c$	t t t	g t c	a t g	a a g	9 1 2
Arg	Gly	Asp	Ala	Суs	Glu	Gly	Asp	Thr	Gly	Gly	Pro	Phe	V a l	Met	Lys	
	290					295					3 0 0					
agc	ССС	ttt	аас	аас	C g C	t g g	tat	caa	a t g	ggc	a t c	gtc	t c a	t g g	g g t	960
		P h e														0 0 0
305						111					110				3 2 0	
		4 4													0 2 0	1 0 0 0
		tgt														1008
Glu	Gly	Суѕ	Asp		Asp	Gly	Lуs	Tyr		Phe	Tyr	Thr	His		Phe	
				3 2 5					3 3 0					3 3 5		
cg c	\mathfrak{c} t g	aag	aag	t g g	a t a	cag	aag	g t c	a t t	g a t	cag	t t t	gga	gag	t a g	1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	I 1 e	Gln	Lys	V a 1	Пe	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
			3 4 0					3 4 5					3 5 0			
			• • •													
< 2.1	1 >	1 2														
< 2.1		351														
< 2.1		PRT														
< 2.13	3>	Homo	sap	iens												
< 4 0) >	1 2														
Met	Ala	His	V a l	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Суѕ	Leu	Ala	Leu	Ala	
1				5	•				1 0	•				15		
_	_{Δ 11}	Суѕ	Ser	v	V a 1	Hic	Ser	(, 1 n		V a 1	Phρ	A 11	АІа		Gln	
11 I U	ьcu	V J 3	20	ьcu	, u 1	1119	D (I	25	1119	, u 1	1 11 (ьcu	30		0 1 11	
ſ 1 ··	λ1	A		I	I	ſ 1	۸		۸	۸	ጥ ኤ	A 1 ~		C .	C 1	
υIN	AIA	Arg	ser	Lеи	Lеu	υIN		v a I	A L 8	A I 8	1 II T		1 II T	ser	5 I U	
		3 5					4 0					45				

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp

```
5 0
                        5 5
                                             60
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                    7.0
                                        75
65
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                85
                                    90
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
          100
                    1 0 5
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
                            1 2 0
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                   135
                                            140
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                   150
                                        155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                                   170
                165
Tyr lle His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp lle
                  185
           180
                                                    190
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                            200
        195
                                                 205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
    2 1 0
                        2 1 5
                                             220
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                    230
                                        235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                    250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                265
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        275
                            280
                                                285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Thr Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                        295
                                             3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
            3 1 0
                                 3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                                    3 3 0
                3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                3 4 5
                                                     350
<210> 13
<211> 1056
<212> DNA
<213>
      Homo sapiens
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
       CDS
< 2 2 2 >
      (1)...(1056)
< 2 2 3 >
```

<400> 13

Met	Ala	His	V a l	Arg	G 1 y	Leu	Gln	L e u		Gly	Cys	Leu	Ala		Ala		
1	0 + 0	t a t	0 0 0	5	a t a	0.0.0	0 6 0	0.0.0	10	a + a	t t c	0 + 0	a o t	15	0.0.0	0.6	
												ctg				9 6	
Ald	Lеu	Cys	20	Leu	V d I	піз	261	25	піз	VdI	rne	Leu	3 0	0 1 1	GIII		
саа	gca	Cgg	tcg	$\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{g}$	\mathfrak{c} t \mathfrak{c}	cag	C g g	g t c	C g g	сва	асс	gcc	асс	a g t	gag	1 4 4	
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	V a l	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu		
		3 5					4 0					4 5					
												gga				192	
Туr		Thr	Phe	Phe	Asn		Arg	Thr	Phe	Gly		Gly	Glu	Ala	Asp		
	5 0					5 5					6 0					0.1.0	
												gag				2 4 0	
	Gly	Leu	Arg	Pro		Phe	Glu	Lys	Lуs		Leu	Glu	Asp	Lуs			
65			. 4 .	. 4	70	4	4.0.0			7 5		. 4 4			8 0	0.0.0	
												att				288	
GIU	Arg	GIU	Leu	ьеи 85	GIU	261	IУГ	116	9 0	GIY	Arg	Пe	vai	9 5	GIY		
t c a	a a t	a c a	n 2 n		a a c	a t a	tra	cct		cam	a t a	a t g	ctt		C 41 41	3 3 6	
												Met				0 0 0	
501	пор	ΛΙα	100	110	01,	W C t	501	105	11 p	OIII	v a i	W C t	110	1 11 0	1118		
aag	agt	ССС		gag	ctg	ctg	t g t		gcc	agc	ctc	a t c		gac	C g C	3 8 4	
												I l e					
- •		115					1 2 0	•				1 2 5		•			
t g g	g t c	\mathfrak{c} t \mathfrak{c}	асс	g C C	g C C	сас	t g c	\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{c}	c t g	t a c	ССВ	$C \; C \; C$	t g g	gac	a a g	4 3 2	
Trp	V a l	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Суs	Leu	Leu	Туr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys		
	1 3 0					1 3 5					1 4 0						
												aag				4 8 0	
	Phe	Thr	Glu	Asn		Leu	Leu	Val	Arg		Gly	Lys	His	Ser			
145		4			150					155					160	r o o	
												ttg				5 2 8	
1 111 1	AIg	Iyi	GIU	165	A 5 II	116	GIU	ГАЗ	1 7 0	261	Met	Leu	GIU	175	116		
t a c	a t c	сас	c c c	agg	t a c	аас	t g g	Сдд	gag	аас	c t g	g a c	Сдд	аас	a t t	5 7 6	
Tyr	Ιlе	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asn	Ιlе		
			180					185					190				
												g a c				6 2 4	
Ala	Leu		Lys	Leu	Lys	Lys		Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	lle	His		
,		195					200					205	,			0.7.0	
												ttg				6 7 2	
Pro	v a 1 2 1 0	СУS	Leu	Pro	Asp	Arg 215	GIU	ınr	Ala	Ala	2 2 0	Leu	Leu	GIN	Ala		
gga	$t\ a\ c$	aag	ggg	Сдд	g t g	a c a	ggc	t g g	ggc	аас	\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{g}	aag	gag	a c g	t g g	7 2 0	
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	V a l	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp		
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0		
												c a g				768	
Thr	Ala	Asn	V a l		Lys	Gly	Gln	Pro		V a l	Leu	Gln	V a l		Asn		
				2 4 5					250					255			
												асс				8 1 6	
Leu	rro	116		6 I U	Arg	rro	v a I		Lys	Asp	5 e r	Thr		1 1 e	Arg		
			260					265					270				

	a c t															8 6 4
He	Thr	A s p 2 7 5	Asn	Met	Phe	Суѕ	A I a 2 8 0	Gly	Tyr	Lys	Pro	A s p 2 8 5	Glu	Gly	Lys	
сва	ggg	$g\ a\ t$	gcc	t g t	g a a	${\tt g}\ {\tt c}\ t$	gac	${\tt g} \ {\tt c} \ t$	ggg	gga	$C \; C \; C$	t t t	g t c	a t g	aag	9 1 2
Arg	Gly	Asp	Ala	Суѕ	Glu		Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	P h e	V a l	Met	Lys	
	290					295					300					
	c c c															960
	Pro	Phe	Asn	Asn		Trp	Туr	Gln	Met		Пe	V a l	Ser	Trp		
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0	
	ggC															1008
Glu	Gly	Суѕ	Asp		Asp	Gly	Lуs	Tyr		Phe	Tyr	Thr	His		Phe	
				3 2 5					3 3 0					3 3 5	i	1050
	ctg														t a g	1056
Arg	Leu	Lуs		lrp	Пе	GIn	Lys		Пе	Asp	GIn	Phe		Glu		
			3 4 0					3 4 5					350			
< 21 () \ 1															
<211		l 4 3 5 1														
< 2 1 2		RT														
<213			sapi	ienc												
1211	, , ,	i v iii v	5 ар	CHS												
< 4 0 () > 1	4														
	Ala		V a l	Arg	G 1 v	Leu	Gln	Leu	Pro	Glv	Cvs	Leu	Ala	Leu	Ala	
1				5					1 0	·	·			15		
Ala	Leu	Суѕ	Ser	Leu					His	V a l	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
			2 0					25					3 0			
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	V a l	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		3 5					4 0					4 5				
	Gln											Gly	Glu	Ala	Asp	
	5 0					5 5					6 0					
Суѕ	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	P h e	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
6 5					70					7 5					8 0	
Glu	Arg	Glu	Leu		Glu	Ser	Tyr	Пlе		Gly	Arg	Пlе	V a l		Gly	
				8 5					9 0					95		
Ser	Asp	Ala		Пе	Gly	Met	Ser		Trp	Gln	V a l	Met		Phe	Arg	
		D	100			ī	~	105					1 1 0			
Lys	Ser		GIn	Glu	Leu	Leu		GIy	Ala	Ser	Leu		Ser	Asp	Arg	
т.	V - 1	115	Т 1	۸1.	4.1	11.	1 2 0	Ι.	Ι.	т	D	125	т.	A .	ī	
irp	Val	Leu	ınr	Ala			Cys	Leu	Leu	ıyr		Pro	irp	Asp	Lys	
100	130	ТЬ.	C 1	100		135	1	V o 1	A = a	11.	140	Lvo	11: 0	C	1 - "	
	P h e	Inr	ьги	ASII		Leu	Leu	vai	Arg		GIY	Lys	НIS	ser		
145 Thr	A = a	Тиг	(1.0	Ara	150	[] A	(1.1.	Luc	I 1 ^	155	Mo +	Lon	(1	Iwa	160	
1111	Arg	1) [υIU	Arg 165	W 2 II	116	ษาแ	гλ?	1 7 0	261	wet	ьeu	υIU		116	
Тиг	Ιla	Ціс	Pra		Тиг	Acn	Trn	Δια		Δου	I A 11	Acn	Ara	175	I 1 ^	
ıyl	Пе	11 1 2	180	VIE	1) [U 2 II	111	185	υIU	V ? II	ьeu	V 2 h	A 1 g	V 2 II	116	
ΔΙα	Leu	MΔt		Ι Δ 11	l v c	Ive	Pra		ΔΙα	Ph△	Sar	Δcn		[] _Δ	Hic	
n I a	ьcu	195	грэ	ьcu	грэ	டர3	200	v a 1	11 I a	1 11 5	DUI	205	1 1 1	115	11 1 2	
Pro	V a l		[, <u>A</u> 11	Pro	Acn	Arσ		Thr	Ala	Ala	Ser		[, <u>A</u> 11	(, 1 n	Ala	
110	2 1 0	\vee \mathfrak{z}	∟ou	110	tro h	215	oru	1 11 1	11 I a	11 I a	220	⊔ v u	ьvu	0 I II	11 1 U	
	7 I V					210					2 L V					

```
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                        2 3 5
2 2 5
                    2 3 0
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                    250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                265
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        2 7 5
                            280
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
    2 9 0
                        295
                                             300
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                    3 1 0
                                         3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                                    3 3 0
                3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                3 4 5
<210> 15
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
\langle 2 \ 2 \ 2 \rangle (1).. (1056)
< 2 2 3 >
< 4 0 0 > 1 5
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                    1 0
                                                                       96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                                25
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                       144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
        35
                            4 0
                                                 4 5
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                       1 9 2
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    5 0
                        55
                                             60
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                       2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                7 0 7 5
                                                                      288
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                85
                                     90
                                                                      336
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            100
                                105
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
                                                                      384
```

Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu		G 1 y	Ala	Ser	Leu		Ser	Asp	Arg	
		1 1 5					1 2 0					1 2 5				1.0.0
		ctc														4 3 2
Trp		Leu	Thr	Ala	Ala		Суѕ	Leu	Leu	Tyr		Pro	Trp	Asp	Lys	
	1 3 0					1 3 5					1 4 0					
	t t c							gtg						t c c		480
	Phe	Thr	Glu	Asn		Leu	Leu	V a l	Arg		Gly	Lys	His	Ser		
1 4 5					150					155					160	
		t a c													a t c	5 2 8
Thr	Arg	Туr	Glu		Asn	Пe	Glu	Lуs		Ser	Met	Leu	Glu		Пlе	
				165					170					175		
		cac												g a c	a t t	5 7 6
Туr	Пe	His		Arg	Туr	Asn	Trp		Glu	Asn	Leu	Asp		Asp	Пlе	
			180					185					190			
		a t g												a t t		6 2 4
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys		V a l	Ala	Phe	Ser		Туr	Пlе	His	
		195					200					205				
cct		t g t														6 7 2
Pro		Суѕ	Leu	Pro	Asp		Glu	Thr	Ala	Ala		Leu	Leu	Gln	Ala	
	2 1 0					2 1 5					2 2 0					
gga	t a c	a a g	ggg	C g g	g t g	a c a	g g C	t g g	ggC	a a c	ctg	a a g	gag	acg	t g g	7 2 0
	Туr	Lуs	Gly	Arg		Thr	Gly	Trp	Gly		Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0	
		a a c												g t g	a a c	768
Thr	Ala	Asn	Val		Lys	Gly	Gln	Pro		Val	Leu	Gln	V a l		Asn	
				2 4 5					250					255		
		a t t												a t c	$c \ g \ c$	8 1 6
Leu	Pro	Ilе		Glu	Arg	Pro	V a l		Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ilе	Arg	
			260					265					270			
		gac														8 6 4
Пlе	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Туr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		2 7 5					280					285				
c g a	ggg	g a t	gcc	t g t	g a a	g g t	g a c	gtt	ggg	gga	$c\ c\ c$	t t t	g t c	a t g	aag	9 1 2
Arg		Asp	Ala	Сус	Glu		Asp	V a l	Gly	Gly		P h e	V a l	Met	Lys	
	290					295					3 0 0					
a g c	$C \; C \; C$	t t t	a a c	a a c	C B C	t g g	t a t	саа	a t g	ggC	a t c	g t c	t c a	t g g	ggt	960
Ser	Pro	P h e	Asn	Asn	Arg	Trp	Туr	Gln	Met	G 1 y	Ilе	V a l	Ser	Trp	Gly	
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0	
g a a	ggc	t g t	gac	C g g	g a t	ggg	a a a	t a t	ggC	t t c	t a c	$a \in a$	c a t	g t g	t t c	1008
Glu	Gly	Сус	Asp		Asp	Gly	Lys	Туr	Gly	P h e	Tyr	Thr	His	V a l	P h e	
				3 2 5					3 3 0					3 3 5		
c g c	$c\ t\ g$	a a g	a a g	t g g	a t a	cag	aag	g t c	a t t	g a t	сав	t t t	gga	gag	t a g	1056
Arg	Leu	Lys		Trp	Ιlе	Gln	Lys		Ilе	Asp	Gln	P h e		Glu		
			3 4 0					3 4 5					3 5 0			

<210> 16

<211> 351

< 2 1 2 > PRT

<213> Homo sapiens

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln 25 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu 4 0 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp 55 6.0 Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr 7.0 7.5 Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly 9 0 85 Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg 105 $1 \ 0 \ 0$ Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg 1 1 5 1 2 0 1 2 5 Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys 135 1 4 0 Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg 150 155 1 4 5 Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile 165 170 Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile 185 180Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His 200 205 Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala 2 1 0 2 1 5 2 2 0 Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp 2 3 0 235 Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn 2 4 5 250 Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg 265 270 260 lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys 2 7 5 285 280 Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys 295 290 300 Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly 3 1 0 3 1 5 Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe 3 2 5 3 3 0 Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu 3 4 0 3 4 5 350

<210> 17 <211> 1056 <212> DNA

<213> Homo sapiens

```
< 2 2 0 >
<221> CDS
\langle 222 \rangle (1).. (1056)
< 2 2 3 >
\langle 4 \ 0 \ 0 \rangle = 17
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                        4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                     10
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                         96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            20
                                 25
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                        144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                             4 0
                                                                        192
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                         55
                                              6 0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                        2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                    7 0
                                         75
65
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                        288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr lle Asp Gly Arg lle Val Glu Gly
                85
                                     90
                                                          95
                                                                        3 3 6
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            100
                                 105
                                                      110
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
                                                                        3 8 4
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
        1 1 5
            1 2 0
tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag
                                                                        4 3 2
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                    1 3 5
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc
                                                                        480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                    150
1 4 5
                                         155
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc
                                                                        5 2 8
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                    170
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att
                                                                        5 7 6
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
           180
                                 185
                                                                        624
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                             200
        195
                                                  205
cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct
                                                                        672
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                         2 1 5
                                              220
```

gga tac aag ggg cgg gtg aca ggc tgg ggc aac ctg aag gag acg tgg

G 1 y 2 2 5	Туr	Lys	Gly	Arg	V a l 2 3 0	Thr	Gly	Trp	G 1 y	A s n 2 3 5	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp 240	
	g C C	аас	gtt	ggt	aag	ggg	сав	ССС	a g t	gtc	c t g	сав	gtg	gtg	аас	768
					Lys									Val	Asn	
	*			2 4 5	_,,				250			*		255		
ctø	ccc	a t t	gtg		Сдд	C C g	g t c	tec		gac	tcc	асс	Cpp		CgC	8 1 6
					Arg											010
Lсu	110	110	260	oru	11 1 8	110	* a 1	265	Гјз	изр	501	1 11 1	270	110	111 8	
0 + 0	00 +			0 + 4	+ + 0	+ ~ +	a o t		+ 0 0	0.0.0	0.0.+	" o t			0.00	0 6 1
					ttc									ggg		8 6 4
rre	ınr	2 7 5	ASII	мет	Phe	Cys	A 1 a 2 8 0	GIY	ıyr	Lys	rro	285	GIU	GIY	Lys	
					gaa											9 1 2
Arg	Gly	Asp	Ala	Суѕ	Glu	Gly	Asp	Asp	Gly	Gly	Pro	Phe	V a l	Met	Lys	
	290					295					300					
agc	$C \; C \; C$	t t t	аас	аас	$C \; g \; C$	t g g	t a t	саа	a t g	ggC	a t c	g t c	$t\ c\ a$	t g g	ggt	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	I 1 e	V a l	Ser	Trp	Gly	
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0	
gaa	ggc	t g t	gac	Сдд	g a t	ggg	a a a	t a t	ggc	t t c	t a c	аса	cat	gtg	t t c	1008
					Asp										Phe	
	·	·		3 2 5	-	·	·	·	3 3 0		·			3 3 5		
CgC	ctg	aag	aag		a t a	cag	aag	gtc		gat	cag	t t t	gga		t a g	1056
					I l e										ιασ	1 0 0 0
1118	Lcu	டர்	3 4 0	пр	110	OIII	цз	3 4 5	110	пор	0111	1 11 0	350	Olu		
< 2 1 () >	18	0.0					0.10								
< 2.1		351														
< 211		351 PRT														
< 2 1 2	2> 1	PRT	can	ienc												
	2> 1		sap	i e n s												
< 2 1 3 < 2 1 3	2> 1 3> 1	PRT Homo	sap	iens												
< 2 1 2 < 2 1 3 < 4 0 0	2> 3>)>	PRT Homo 18			ſ l v	Lou	(l n	Lou	Pro	ſlv	C v c	Lou	A 1 a	Lon	A 1 a	
< 2 1 2 < 2 1 3 < 4 0 0	2> 3>)>	PRT Homo 18		Arg	Gly	Leu	Gln	Leu		G 1 y	Суѕ	Leu	Ala		Ala	
< 2 1 2 4 0 0 M e t 1	2 > 1 3 > 1 0 > A 1 a	PRT Homo 18 His	V a l	Arg 5					1 0					15		
< 2 1 2 4 0 0 M e t 1	2 > 1 3 > 1 0 > A 1 a	PRT Homo 18 His	V a l S e r	Arg 5	Gly Val			Gln	1 0				Ala	15		
< 2 1 2 < 2 1 3 < 4 0 0 Me t 1 A 1 a	2 > 1 3 > 1) > A 1 a L e u	PRT Homo 18 His Cys	Val Ser 20	Arg 5 Leu	V a l	His	Ser	G 1 n 2 5	10 His	V a l	Phe	L e u	A 1 a 3 0	15 Pro	Gln	
< 2 1 2 < 2 1 3 < 4 0 0 Me t 1 A 1 a	2 > 1 3 > 1) > A 1 a L e u	PRT Homo 18 His Cys Arg	Val Ser 20	Arg 5 Leu		His	Ser Arg	G 1 n 2 5	10 His	V a l	Phe	L e u A l a	A 1 a 3 0	15 Pro	Gln	
< 2 1 2 2 1 3 3 4 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n	2 > 1 3 > 1 0 > A 1 a L e u	PRT Homo 18 His Cys Arg 35	Val Ser 20 Ser	Arg 5 Leu Leu	V a l L e u	His Gln	Ser Arg 40	G 1 n 2 5 V a 1	1 0 H i s A r g	V a l A r g	Phe Thr	Leu Ala 45	A 1 a 3 0 T h r	15 Pro Ser	Gln Glu	
< 2 1 2 2 1 3 3 4 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n	2 > 1 3 > 1 0 > A 1 a L e u	PRT Homo 18 His Cys Arg 35	Val Ser 20 Ser	Arg 5 Leu Leu	V a l	His Gln	Ser Arg 40	G 1 n 2 5 V a 1	1 0 H i s A r g	V a l A r g	Phe Thr	Leu Ala 45	A 1 a 3 0 T h r	15 Pro Ser	Gln Glu	
<pre>< 2 1 2 < 2 1 3 < 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n T y r</pre>	2 > 1 3 > 1 0 > A 1 a L e u A 1 a G 1 n 5 0	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr	V a 1 S e r 2 0 S e r	Arg 5 Leu Leu Phe	V a l L e u A s n	His Gln Pro 55	Ser Arg 40 Arg	G 1 n 2 5 V a 1 T h r	10 His Arg Phe	Val Arg Gly	Phe Thr Ser 60	Leu Ala 45 Gly	Ala 30 Thr	15 Pro Ser Ala	Gln Glu Asp	
<pre>< 2 1 2 < 2 1 3 < 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n T y r C y s</pre>	2 > 1 3 > 1 0 > A 1 a L e u A 1 a G 1 n 5 0	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr	V a 1 S e r 2 0 S e r	Arg 5 Leu Leu Phe	Val Leu Asn Leu	His Gln Pro 55	Ser Arg 40 Arg	G 1 n 2 5 V a 1 T h r	10 His Arg Phe	Val Arg Gly Ser	Phe Thr Ser 60	Leu Ala 45 Gly	Ala 30 Thr	15 Pro Ser Ala	Gln Glu Asp Thr	
<pre>< 2 1 3 < 2 1 3 < 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n T y r C y s 6 5</pre>	2 > 1 3 > 1 0 > A 1 a L e u A 1 a G 1 n 5 0 G 1 y	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr	Val Ser 20 Ser Phe	Arg 5 Leu Leu Phe	Val Leu Asn Leu 70	His Gln Pro 55 Phe	Ser Arg 40 Arg	G 1 n 2 5 V a 1 T h r	10 His Arg Phe Lys	Val Arg Gly Ser	Phe Thr Ser 60 Leu	Leu Ala 45 Gly	Ala 30 Thr Glu Asp	15 Pro Ser Ala Lys	Gln Glu Asp Thr 80	
<pre>< 2 1 3 < 2 1 3 < 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n T y r C y s 6 5</pre>	2 > 1 3 > 1 0 > A 1 a L e u A 1 a G 1 n 5 0 G 1 y	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr	Val Ser 20 Ser Phe	Arg 5 Leu Leu Phe Pro	Val Leu Asn Leu	His Gln Pro 55 Phe	Ser Arg 40 Arg	G 1 n 2 5 V a 1 T h r	10 His Arg Phe Lys	Val Arg Gly Ser	Phe Thr Ser 60 Leu	Leu Ala 45 Gly	Ala 30 Thr Glu Asp	15 Pro Ser Ala Lys Glu	Gln Glu Asp Thr 80	
<pre>< 2 1 2 < 2 1 3 < 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n T y r C y s 6 5 G 1 u</pre>	2 > 1 3 > 1 0 > A 1 a L e u A 1 a G 1 n 5 0 G 1 y	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu	Arg 5 Leu Leu Phe Pro	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr	G 1 n 2 5 V a 1 T h r L y s	10 His Arg Phe Lys Asp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu	Ala 30 Thr Glu Asp	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95	Gln Glu Asp Thr 80 Gly	
<pre>< 2 1 2 < 2 1 3 < 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n T y r C y s 6 5 G 1 u</pre>	2 > 1 3 > 1 0 > A 1 a L e u A 1 a G 1 n 5 0 G 1 y	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu	Arg 5 Leu Leu Phe Pro	Val Leu Asn Leu 70	His Gln Pro 55 Phe Ser	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr	Gln 25 Val Thr Lys Ile	10 His Arg Phe Lys Asp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu	Ala 30 Thr Glu Asp Val	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95	Gln Glu Asp Thr 80 Gly	
<pre>< 2 1 2 < 2 1 3 < 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n T y r C y s 6 5 G 1 u S e r</pre>	2 > 1 3 > 1 0 > Ala Leu Ala Gln 5 0 Gly Arg	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e Pro 1 0 5	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met	A 1 a 3 0 T h r G 1 u A s p V a 1 L e u 1 1 0	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg	
<pre>< 2 1 2 < 2 1 3 < 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n T y r C y s 6 5 G 1 u S e r</pre>	2 > 1 3 > 1 0 > Ala Leu Ala Gln 5 0 Gly Arg	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala Pro	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e Pro 1 0 5	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met	A 1 a 3 0 T h r G 1 u A s p V a 1 L e u 1 1 0	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg	
<pre>< 2 1 2 < 2 1 3 < 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n T y r C y s 6 5 G 1 u S e r L y s</pre>	2 > 1 3 > 1 0 > Ala Leu Ala Gln 5 0 Gly Arg	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala Pro 115	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile Glu	Val Leu Asn Leu 70 Glu Leu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met Leu	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e Pro 1 0 5 G 1 y	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg	
<pre>< 2 1 2 < 2 1 3 < 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n T y r C y s 6 5 G 1 u S e r L y s</pre>	2 > 1 3 > 1 0 > A 1 a L e u A 1 a G 1 n 5 0 G 1 y A r g S e r V a 1	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala Pro 115	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile Glu	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His GIn Pro 55 Phe Ser Met Leu His	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e Pro 1 0 5 G 1 y	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val Leu Pro	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg	
<pre>< 2 1 2 < 2 1 3 < 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n T y r C y s 6 5 G 1 u S e r L y s</pre>	2 > 1 3 > 1 0 > Ala Leu Ala Gln 5 0 Gly Arg	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala Pro 115	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile Glu	Val Leu Asn Leu 70 Glu Leu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met Leu	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e Pro 1 0 5 G 1 y	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg	
<pre><213 <213 <400 Met 1 Ala Gln Tyr Cys 65 Glu Ser Lys Trp</pre>	2 > 1 3 > 1 0 > A 1 a L e u A 1 a G 1 n 5 0 G 1 y A r g S e r V a 1 1 3 0	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala Pro 115 Leu	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln Thr	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile Glu Ala	Val Leu Asn Leu 70 Glu Leu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met Leu His 135	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120 Cys	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e Pro 1 0 5 G 1 y Le u	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp Ala Leu	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val Leu Pro 140	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125 Pro	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe Asp	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg Lys	
<pre><213 <213 <400 Met 1 Ala Gln Tyr Cys 65 Glu Ser Lys Trp</pre>	2 > 1 3 > 1 0 > A 1 a L e u A 1 a G 1 n 5 0 G 1 y A r g S e r V a 1 1 3 0	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala Pro 115 Leu	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln Thr	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile Glu Ala	Val Leu Asn Leu 70 Glu Leu Ala	His Gln Pro 55 Phe Ser Met Leu His 135	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120 Cys	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e Pro 1 0 5 G 1 y Le u	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp Ala Leu	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val Leu Pro 140	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125 Pro	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe Asp	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg Lys	

```
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                      170
                165
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
                        185
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                             200
        195
                                                 205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                        2 1 5
                                             2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
225
                    2 3 0
                                         235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                     250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                 265
                                                     270
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
                            280
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Asp Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
    290
                       295
                                             3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                    3 1 0
                                         3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                          3 3 0
                3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                 3 4 5
                                                     350
< 2 1 0 > 1 9
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
\langle 2 2 2 \rangle (1).. (1056)
< 2 2 3 >
<400> 19
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                        48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                     1 0
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                        96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                                 25
            20
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                       1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
        35
                            4 0
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                       192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                         5 5
                                             6.0
                                                                       2 4 0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag tcg ctg gag gac aaa acc
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
```

6 5					7 0					7 5					8 0	
	aga	gag	ctc	ctg		tcc	t a c	a t c	gac		свс	a t t	gtg	gag		288
												I I e				
				8 5					9 0	·				9 5		
t c g	gat	gca	gag	a t c	ggc	a t g	t c a	c c t	t g g	сав	gtg	a t g	ctt	t t c	сдд	3 3 6
												Met				
			100					105					110			
a a g	a g t	$C \; C \; C$	cag	gag	c t g	c t g	t g t	ggg	gcc	a g c	$c\;t\;c$	a t c	a g t	gac	c g c	3 8 4
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Пlе	Ser	Asp	Arg	
		115					120					1 2 5				
t g g	g t c	$c\;t\;c$	асс	gcc	gcc	сас	$t \ g \ c$	$c\;t\;c$	c t g	t a c	ССВ	$C \; C \; C$	t g g	gac	a a g	4 3 2
Trp	V a l	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Сус	Leu	Leu	Tyr	Pro	P r o	Trp	Asp	Lys	
	130					1 3 5					1 4 0					
												a a g				4 8 0
	Phe	Thr	Glu	Asn		Leu	Leu	V a l	Arg		Gly	Lys	His	S e r		
1 4 5					150					155					160	5.0.0
												ttg				5 2 8
Thr	Arg	Tyr	Glu		Asn	He	Glu	Lуs		Ser	Met	Leu	Glu		Пе	
,				165					170		,			175		F 7 0
												gac				5 7 6
ıyr	1 1 e	HIS		Arg	IУr	ASI	irp		GIU	Asn	Lеи	Asp		ASD	1 1 e	
a c c	c t a	n t a	180	c t a	2 2 4	2 2 4	c c t	185	a c c	ttc	a a t	a a c	190	a t t	C 1 C	6 2 4
												g a c A s p				0 4 4
ЛΙά	Lси	195	Гјз	Lси	ГЪЗ	Гјз	200	v a i	πια	1 11 6	261	205	1) 1	116	11 1 2	
c c t	σtσ		c t o	C	gar	200		2 C G	o c a	g c c	a o c	ttg	ctc	cag	σ c t	672
												Leu				0 1 2
110	2 1 0	0,5	Бой	110	пор	215	oru	1 11 1	71 T W	71 T U	2 2 0	Бои	БСС	0111	71 T U	
gga		aag	ggg	сдд	gtg		ggc	tgg	ggc	аас		aag	gag	a c g	t g g	7 2 0
												Lys				
2 2 5		•			2 3 0			-		235		•			2 4 0	
аса	gcc	аас	g t t	g g t	aag	ggg	cag	ССС	a g t	g t c	c t g	cag	g t g	gtg	аас	768
Thr	Ala	Asn	V a l	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	V a l	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
				2 4 5					250					255		
$c\ t\ g$	$c\ c\ c$	a t t	g t g	gag	C g g	ССВ	g t c	$t \ g \ c$	aag	gac	$t\ c\ c$	асс	c g g	a t c	c g c	8 1 6
Leu	Pro	Пe	V a l	Glu	Arg	Pro	V a l	C y s	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Пe	Arg	
			260					265					270			
												g a t				8 6 4
Пe	Thr		Asn	Met	P h e	Суѕ		Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		2 7 5					280					285				0.1.0
												ttt				9 1 2
Arg		Asp	Ala	Суѕ	Glu		Asp	Asn	Gly	Gly		Phe	V a I	Met	Lys	
	290					295	1 - 1				3 0 0	. 1	4 -	1		0.00
												gtc				9 6 0
5 e r 3 0 5	110	1 H 6	W 2 II	W 2 II	Arg 310	111	ıyſ	υIII	wet	3 1 5	116	V a l	261	111	3 2 0	
	aac	t a t	0 2 0	c a a		0 0 0	221	t 2 t	gar		tac	аса	cat	a t a		1008
												Thr				1 0 0 0
oru	013	013	нэр	325	нэр	OIJ	டர3	1 1 1	330	1 11 6	1 1 1	1 11 1	1119	335	1 11 6	
C g c	ctø	aag	aag		a t a	Cag	aag	gtc		gat	Cag	ttt	gga		t a ø	1 0 5 6
000	v • b	u u b	u u b	.00	utu	v u b	u u b	0		out	. u b		oou	oub	·ub	1000

```
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                 3 4 5
< 2 1 0 >
       20
<211>
       351
<212>
      PRT
< 2 1 3 >
       Homo sapiens
< 4 0 0 >
       2.0
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                                     10
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                                 25
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                             4 0
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    5 0
                         5 5
                                              6 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                    7 0
                                          75
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                                     90
                85
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            100
                                 105
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
                            1 2 0
        1 1 5
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                        1 3 5
                                              1 4 0
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
1 4 5
             150
                                     155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                     170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
           180
                             185
                                                      190
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                             200
        195
                                                  205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
    2 1 0
                         2 1 5
                                              2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
2 2 5
                     2 3 0
                                          235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                      250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
                                                      270
            260
                                 265
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
                             280
                                                  285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Asn Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                        295
    290
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                    3 1 0
                                          3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
```

Arg Lei		ys Trp	lle Gln	Lys Val 345	lle Asp	Gln Phe	Gly Gl 350	l u	
<210><211><211><212><213>	2 1 1 0 5 6 D N A H o m o s	apiens							
< 2 2 0 > < 2 2 1 > < 2 2 2 > < 2 2 3 >	CDS (1) (1056)							
< 4 0 0 >	2 1								
					cct ggc Pro Gly 10			eu Ala	4 8
		er Leu			cat gtg His Val				9 6
	a cgg t	cg ctg		cgg gtc	cgg cga Arg Arg		acc a g		1 4 4
	act t			agg acc	ttt ggc Phe Gly	t c g g g a			192
tgt ggg			ctg ttc		aag tcg Lys Ser 75	ctg gag	gac aa Asp Ly	aa acc ys Thr 80	2 4 0
gaa aga			gaa tcc		gac ggg Asp Gly			ag ggc Iu Gly	288
	Ala G	ag atc			tgg cag Trp Gln		ctt t	tc cgg	3 3 6
					gcc agc Ala Ser		agt ga Ser As		3 8 4
	l Leu T				ctg tac Leu Tyr				4 3 2
aac tto Asn Phe 145					cgc att Arg Ile 155				4 8 0
					ata tcc Ile Ser 170			ys Ile	5 2 8
		cc agg			gag aac Glu Asn		cgg aa	ac att	5 7 6

3 3 0

3 3 5

3 2 5

		180		185			190		
g c c	ctg atg	aag ctg	aag aag c	ct gtt	gcc ti	tc agt g	ac tac	att cac	6 2 4
Ala	Leu Met	Lys Leu	Lys Lys P	ro Val	Ala Pi	ne Ser A	sp Tyr	lle His	
	195		2	0 0		2) 5		
$c\ c\ t$	gtg tgt	ctg ccc	gac agg g	ag acg	gca g(cc agc t	tg ctc	cag gct	672
			Asp Arg G				eu Leu (Gln Ala	
	2 1 0		2 1 5			2 2 0			
gga	tac aag	ggg cgg	g t g a c a g	gc tgg	ggc a a	ac ctg a	ag gag	acg tgg	7 2 0
Gly	Tyr Lys	Gly Arg	Val Thr G	aly Trp	Gly As	sn Leu L	s Glu '	Thr Trp	
2 2 5			2 3 0		2 3			2 4 0	
аса	gcc aac	gtt ggt	aag ggg c	ag ccc	agt gi	tc ctg c	ag gtg	gtg aac	768
Thr	Ala Asn	Val Gly	Lys Gly G	aln Pro	Ser Va	al Leu G	In Val	Val Asn	
		2 4 5			250			2 5 5	
ctg	ccc att	gtg gag	cgg ccg g	tc tgc	aag ga	ac tee a	c c g g	atc cgc	8 1 6
Leu	Pro Ile	Val Glu	Arg Pro V	al Cys	Lys As	sp Ser Tl	nr Arg	lle Arg	
		2 6 0		265			270		
a t c	act gac	aac atg	ttc tgt g	ct ggt	tac aa	ag cct g	at gaa	ggg aaa	8 6 4
Пe	Thr Asp	Asn Met	Phe Cys A	ala Gly	Tyr Ly	s Pro A	sp Glu (Gly Lys	
	2 7 5		2	8 0		2 3	3 5		
сва	ggg gat	gcc tgt	gaa ggt g	ac gct	g g g g g	ga ccc t	tt gtc :	atg aag	9 1 2
Arg	Gly Asp	Ala Cys	Glu Gly A	asp Ala	Gly Gl	ly Pro Pi	ne Val M	Met Lys	
	2 9 0		295			3 0 0			
a g c	ccc ttt	a a c a a c	cgc tgg t	at caa	atg gg	gcatcg	tc tca	tgg ggt	960
Ser	Pro Phe	Asn Asn	Arg Trp T	`yr Gln	Met Gl	ly Ile V	al Ser '	Γrp Gly	
3 0 5			3 1 0		3]	15		3 2 0	
gaa	ggc tgt	gac cgg	gat ggg a	aa tat	ggc ti	tc tac a	ca cat	gtg ttc	1008
Glu	Gly Cys	Asp Arg	Asp Gly L	ys Tyr	Gly Ph	ne Tyr Tl	r His'	Val Phe	
		3 2 5			3 3 0		;	3 3 5	
			ata cag a					gag tag	1 0 5 6
Arg	Leu Lys		lle Gln L			sp Gln Pl		Ĝ l u	
		3 4 0		3 4 5			3 5 0		
< 21 (
< 2 1 1									
< 2 1 2									
< 2 1 3	3> Homo	sapiens							
Z 1 0 (1 \ 11								
< 4 0 (Vol Ang	Cl. I. I C	·1 I	D	l C I			
	Ala HIS		Gly Leu G	in Leu		IY CYS L			
	Lau Cra	5	Val III c	'a	10	al Dha I		15 Dra Cla	
Ala	Leu Cys		Val His S		піз у	irne L			
(l n	110 120	20 Sar Lan	Leu Gln A	25 .rg V21	Ara A.	ea The A	30 La Thr (Sar Clu	
UIII	A 1 a A 1 g	SEL LEU		arg var . ()	AIE AI	18 III A 41		oci vil	
Tvr		Pho Pho	Asn Pro A		Pho Cl			Ala Acn	
1 7 1	50	1 11 6 1 11 6	55	116 1111	ine G	60	ij UIU <i>I</i>	ria Ush	
Cvc		Aro Pra	Leu Phe G	lu Ive	Ive C		III Acn I	vc Thr	
65	оту вси	1118 110	7 0	iu LJS	Lys 50		iu <i>i</i> sopl	80	
	Arg Glu	Len Len	Glu Ser T	`vr Ila			le Val (
∪ i u	o oru	Dou Dou	J. 4 DOI 1	,	112 h 0 1	. , ,,, , ,		- 1 4 0 1 3	

8 5

```
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
               1 0 5
          100
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
                           1 2 0
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                       1 3 5
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                  150
                                      155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
               165
                                   170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asn Ile
                               185
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
       195
                            200
                                               205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                       2 1 5
                                           2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
               2 3 0
                         2 3 5
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                                   250
               2 4 5
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
           260
                               265
                                                   270
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        275
                           280
                                              285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                       295
                                           300
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305
                   3 1 0
                                       3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
               3 2 5
                                   3 3 0
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
                                                   350
            3 4 0
                                3 4 5
< 2 1 0 > 2 3
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221>
       CDS
< 2 2 2 >
      (1)...(1056)
< 2 2 3 >
< 4 0 0 >
      2.3
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                    4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5
                                                                     96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            20
                                25
                                                   3 0
```

				ctg												1 4 4
		3 5		Leu			4 0					4 5				1.0.0
				t t c P h e												192
	gggg			cct Pro		t t c					c t g					2 4 0
6 5					7 0					7 5					8 0	288
				ctg Leu 85												200
				atc Ile												3 3 6
			100					105					110			2.0.4
				g a g G l u												3 8 4
		c t c		g c c			t g c					ссс				4 3 2
lrp	V a I 1 3 0	Leu	lhr	Ala	Ala	H 1 S 1 3 5	Суѕ	Leu	Leu	lyr	Pro 140	Pro	lrp	Asp	Lys	
				a a t A s n												4 8 0
145				сва	150					155					160	5 2 8
				Arg 165												0 2 0
				agg Arg												5 7 6
			180					185					190			
				ctg Leu												6 2 4
cct	a t a	195	e t a	ССС		n n c	200	200	a c a	a c c	2 0 0	205	ctc	c 1 "	a c t	672
				Pro												0 1 2
				cgg Arg												7 2 0
2 2 5	1) 1	ГЪЗ	GIY	AIg	2 3 0	1 11 1	GIŞ	111	GIJ	235	ьеи	ГЪЗ	GIU	1 11 1	240	
				g g t G l y 2 4 5												7 6 8
				gag					a a g					a t c		8 1 6
Leu	Pro	I I e	V a l 2 6 0	Glu	Arg	rro.	v a I	C y s 2 6 5	Lys	Asp	Ser	lhr	Arg 270	1 l e	Arg	
				a t g M e t												8 6 4
		275					280					285				0.1.0
				t g t C y s												9 1 2

```
290
                         295
                                              3 0 0
                                                                        960
ago coo ttt aac aac ogo tgg tat caa atg ggo ato gto toa tgg ggt
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                                         3 1 5
                    3 1 0
gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc
                                                                       1008
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                3 2 5
                                     3 3 0
cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag
                                                                      1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                 3 4 5
                                                      350
< 2 1 0 > 2 4
<211> 351
<212> PRT
<213> Homo sapiens
< 4 0 0 > 2 4
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                                     1.0
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            20
                                 25
                                                      3.0
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                             4 0
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    50
                        55
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                   70
                                         75
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                                     90
                85
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
                                 105
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
                            120
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                        1 3 5
                                             1 4 0
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
1 4 5
                    150
                                         155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                     170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
            180
                                 185
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                             200
       195
                                                  205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                         2 1 5
                                              2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
225
                 2 3 0
                                     2 3 5
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                     250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
```

		260					265					270			
lle T	Shr Asp		Met	P h e	Суѕ	Ala		Tyr	Lys	Pro	Asp		Gly	Lys	
	2 7 5		0	0.1	. 1	280		0.1	0.1	D	285	77 1	N		
	Gly Asp 290	Ala	Cys	6 I u	A I a 2 9 5	Asp	Ala	GIY	GIY	3 0 0	Phe	Val	Met	Lys	
	ro Phe	Asn	Asn.	Arg		Туr	Gln	Met	Gly		V a l	Ser	Trp	Gly	
3 0 5				3 1 0					3 1 5					3 2 0	
Glu G	Gly Cys		Arg . 325	Asp	G 1 y	Lys	Туr	G 1 y 3 3 0	Phe	Туr	Thr	His	V a l 3 3 5	P h e	
Arg L	Leu Lys	Lуs		Пе	Gln	Lys			Asp	Gln	P h e				
		3 4 0					3 4 5					350			
< 2 1 0 >	> 25														
< 2 1 1 >															
< 2 1 2 >															
< 2 1 3 >	> Homo	sapi	e n s												
< 2 2 0 >	>														
<221>															
< 2 2 2 2 >	(1).	. (105	6)												
< 2 2 3 >	>														
< 4 0 0 >	> 25														
	gcg cac	gtc	сда	ggc	t t g	сад	ctg	c c t	ggc	t g c	ctg	gcc	ctg	g c t	4 8
	Ala His														
1			5					1 0					15		
g C C C	etg tgt	a g c	$c\ t\ t$	gtg	сас	a g c	c a g	$c\ a\ t$	g t g	$t\ t\ c$	$c\ t\ g$	${\tt g}\ {\tt c}\ t$	$c\ c\ t$	cag	96
Ala L	Leu Cys		Leu	Val	His	Ser		His	Val	P h e	Leu		Pro	Gln	
		2 0		. 4 .			25					3 0	4		1.4.4
	g C a C g g														144
GIN A	Ala Arg 35	Ser	Leu	Leu	GIN	Arg 40	vai	Arg	Arg	ınr	A T a	ınr	ser	GIU	
tac c		t t c	t t c	a a t	ссв		асс	ttt	ggc	t c g		gag	gca	gac	192
	Gln Thr														
	5 0				5 5					6 0					
tg t g	ggg ctg	сва	$c\ c\ t$	c t g	$t\ t\ c$	gag	a a g	a a g	$t\ c\ g$	$\mathfrak{c} \ \mathfrak{t} \ \mathfrak{g}$	gag	gac	a a a	acc	2 4 0
	Gly Leu	Arg			P h e	Glu	Lys	Lys		Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
6 5				7 0					7 5					8 0	
	aga gag													ggc	288
Glu A	Arg Glu			Glu	Ser	Tyr	Пе		GIy	Arg	He	V a I		Gly	
tea a	gat gca		85	a a c	a t a	ton	c c t	90	C 1 G	ata	a t a	ctt	95 ttc	e a a	3 3 6
	sat gea Asp Ala														000
~ O I 1		100		J 1 J	0 6	~ 0 1	105	p	V 1 II	· u 1	112 0 6	110	0	0	
a a g a	agt ccc		gag	ctg	c t g	t g t		g c c	a g c	c t c	a t c		gac	C g C	3 8 4
Lys S	Ser Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Пе	Ser	Asp	Arg	
	1 1 5					1 2 0					1 2 5				
	stc ctc												gac		4 3 2
	/al Leu	Thr	Ala.	Ala		Суѕ	Leu	Leu	Tyr		Pro	Trp	Asp	Lys	
l	3 0				1 3 5					1 4 0					

a a c	t t c	асс	gag	a a t	gac	ctt	ctg	g t g	C g C	a t t	ggC	aag	сас	$t\ c\ c$	C g C	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	V a 1	Arg	Пe	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
1 4 5					150					155					160	
a c a	agg	t a c	gag	сва	аас	a t t	gaa	aag	a t a	t c c	a t g	t t g	gaa	aag	a t c	5 2 8
			Glu												Пе	
	_	•		165				·	170					175		
t a c	a t c	сас	ссс		t a c	аас	t g g	Сдд		аас	ctg	gac	Сдд	gac	a t t	5 7 6
														Asp		• • •
. , .	110	11.1.5	180	1110	. , .	71 0 11	11 p	185	014	71 0 11	Боч	710 р	190	71 0 p	110	
g C C	ctg	a t g		ctg	аав	аад	cct		g C C	t t c	a g t	gac		a t t	cac	6 2 4
														I I e		V 3 .
	D o u	195	5,5	D v u	5,0	ביי	200			0	~ 0 .	205	. , .			
cct	gtg		ctø	C	gac	200		ася	g C A	g C C	200		ctc	сав	g c t	672
														Gln		015
110	2 1 0	0 ; 3	Lсu	110	пор	215	oru	1 11 1	71 I u	71 1 u	2 2 0	Lcu	Lcu	0111	71 T U	
gga		225	σσσ	c o o	σtσ		ggc	tσσ	ggr	226		α α σ	σασ	acg	tσσ	7 2 0
														Thr		7 2 0
225	1 1 1	Гјз	013	11 1 8	2 3 0	1 11 1	013	1 1 p	Olj	235	ьси	Гјз	oru	1 11 1	2 4 0	
	o c c	226	gtt	a a t		σσσ	c a o	C	a o t		c t o	cao	a t a	a t a	a a c	768
			Val												Asn	100
1 11 1	ЛΙά	A 2 II	v a i	245	ГХЗ	GIY	GIII	110	250	v a i	Ltu	GIII	v a i	255	V 2 II	
c t a	0.0.0	a + +	a t a		C a a	C C G	a t c	t a c		a n c	t c c	0.00			C	8 1 6
			gtg											atc		0 1 0
Leu	110	116	Val	GIU	AIg	110	v a I		L) 2	Y 2 h	Sel	1 11 1		Пе	AIg	
0 + 0	00 +	<i>a</i> 0 0	260	0 + 0	+ + 0	+ ~ +	a a t	265	t a a	0.0.0	0.0 +	a o t	270		0.00	0 £ 1
			aac											g g g		8 6 4
1 1 e	ınr		ASII	m e t	rne	СУЅ		GIY	ıyr	Lys	Pro		GIU	Gly	Lys	
0		275		4 4			280					285				0.1.0
														atg		9 1 2
Arg							ASP						v a i	Met	Lys	
													4	4	4	0.00
														t g g		960
	Pro	rne	Asn	Asn		lrp	lyr	GIN	Met		I I e	v a i	Ser	Trp		
3 0 5					3 1 0					3 1 5			,		3 2 0	1 0 0 0
gaa			gac												t t c	1008
Glu	GIy	Суѕ	Asp		Asp	GIY	Lуs	lyr		Phe	lyr	lhr	His	Val	Phe	
				3 2 5					3 3 0					3 3 5		1050
			aag												t a g	1 0 5 6
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Пе	GIn	Lys		Пе	Asp	GIn	Phe		Glu		
			3 4 0					3 4 5					3 5 0			
		0.0														
< 21 (26														
< 2 1 1		351														
< 2 1 2		PRT														
< 2 1 3	5 > I	10 m 0	s a p	ı e n s												
/ 1 0 1		D 4														
< 4 0 (2 6			0.1		٥.		D	0.1	0					
Met	Ala	HIS	val		GIY	Leu	GIn	Leu		Gly	C y s	Leu	Ala	Leu	Ala	
1		0	C	5	17		C	0.1	10	77	D.	T	4.1	15	0.1	
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	v a I	His	S e r	GIn	HIS	v a I	P h e	Leu	Ala	Pro	GIn	

```
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                            4 0
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                        5 5
                                              60
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
           7 0
                                         75
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                85
                                     90
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            100
                                 105
                                                      1 1 0
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
                             1 2 0
        1 1 5
                                                  1 2 5
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
    130
                        1 3 5
                                             140
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                    150
                                         155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                                    170
                165
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
            180
                                185
                                                      190
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr lle His
        195
                             200
                                                  205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                         2 1 5
                                              2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                    2 3 0
                                         235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                     250
                                                          255
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                 265
                                                      270
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        2 7 5
                             280
                                                  285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                        295
                                              3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305
                    3 1 0
                                3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                3 2 5
                                    330
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                 3 4 5
                                                      350
< 2 1 0 >
       2.7
< 2 1 1 >
      1056
<212>
       DNA
< 2 1 3 >
       Homo sapiens
```

< 2 2 0 > < 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 >

CDS

(1)...(1056)

< 4 0 () > 27														
a t g	gcg ca	c gtc	сва	g g C	t t g	сав	ctg	c c t	ggc	t g c	ctg	gcc	ctg	g c t	4 8
Met	Ala Hi	s Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Суѕ	Leu	Ala	Leu	Ala	
1			5					10					15		
gcc	ctg tg	t agc	ctt	g t g	сас	a g c	cag	$c\ a\ t$	g t g	t t c	c t g	${\tt g} \ {\tt c} \ {\tt t}$	$c\ c\ t$	cag	96
Ala	Leu Cy	s Ser	Leu	V a l	His	Ser	Gln	His	V a l	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
		2 0					2 5					3 0			
саа	g c a c g	g tcg	ctg	$c\;t\;c$	cag	Сдд	g t c	Сдд	сва	асс	gcc	асс	a g t	gag	1 4 4
Gln	Ala Ar	g Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	V a l	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
	3 5					4 0					4 5				
$t\ a\ c$	cag ac	t ttc	t t c	$a\;a\;t$	ССВ	a g g	acc	t t t	ggC	$t\ c\ g$	gga	gag	gca	gac	192
Туr	Gln Th	r Phe	P h e	Asn	Pro	Arg	Thr	P h e	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	5 0				5 5					6 0					
t g t	ggg ct	g cga	$c\ c\ t$	$\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{g}$	t t c	gag	a a g	a a g	$t\ c\ g$	$c \; t \; g$	gag	gac	a a a	асс	2 4 0
Суѕ	Gly Le	u Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
6 5				70					7 5					8 0	
g a a	aga ga	g ctc	c t g	gaa	$t\ c\ c$	t a c	a t c	g a c	ggg	C g C	a t t	g t g	gag	ggC	288
Glu	Arg Gl	u Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	I I e	Asp	Gly	Arg	lle	Val	Glu	Gly	
			8 5					9 0					95		
$t\ c\ g$	gat gc	a gag	a t c	ggC	a t g	t c a	$c\ c\ t$	t g g	cag	g t g	a t g	c t t	t t c	Cgg	3 3 6
Ser	Asp Al	a Glu	Ιlе	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	V a l	Met	L e u	P h e	Arg	
		100					105					110			
a a g	agt cc	c cag	gag	ctg	ctg	t g t	ggg	gcc	a g c	$c\ t\ c$	a t c	a g t	g a c	CgC	3 8 4
Lуs	Ser Pr	o Gln	Glu	Leu	L e u	Суѕ	Gly	Ala	Ser	Leu	Пe	Ser	Asp	Arg	
	1 1	5				1 2 0					1 2 5				
t g g	gtc ct	с асс	gcc	gcc	сас	t g c	\mathfrak{c} t \mathfrak{c}	$\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{g}$	t a c	C C g	$C \; C \; C$	t g g	gac	a a g	4 3 2
Trp	Val Le	u Thr	Ala	Ala	His	Суѕ	L e u	L e u	Туr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	1 3 0				1 3 5					1 4 0					
a a c	ttc ac	c gag	a a t	gac	ctt	c t g	gtg	C g C	a t t	ggC	a a g	cac	t c c	CgC	4 8 0
	Phe Th	r Glu	Asn		Leu	Leu	V a 1	Arg		Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145				150					155					160	
	agg ta														5 2 8
Thr	Arg Ty	r Glu		Asn	Пе	Glu	Glu		Ser	Met	Leu	Glu		Пe	
			165					170					175		
	atc ca														5 7 6
Туr	Ile Hi		Arg	Tyr	Asn	Trp		Glu	Asn	Leu	Asp		Asp	Пе	
		180					185					190			0.0.4
	ctg at														6 2 4
Ala		t Lys	Leu	Lуs	Lуs		V a I	Ala	Phe	Ser		Tyr	Пе	His	
	1 9					200					205				0.5.0
	gtg tg														672
Pro	Val Cy	s Leu	Pro	Asp		6 I U	lhr	Ala	Ala		Leu	Leu	GIN	Ala	
<i>"</i> " -	210		a **	,, L	2 1 5	<i>"</i>	4	<i>"</i>	0.0.	2 2 0	0.0		0 0	4	7 0 0
gga	tac aa														7 2 0
	Tyr Ly	5 GIY	Arg		ınr	61 y	ırp	GT y		Lеи	LYS	ьIU	ınr		
2 2 5	m 0 0 0 0	0 9 4 4	a a 4	2 3 0		0.0.4	0.0.0	0 % \$	235	0 + 0	0.0.0	a + a	a + a	2 4 0	7 £ 0
	g c c a a														768
1 11 1	Ala As	ıı väl		LУS	υIÿ	υIII	0 1 1		v a I	Lеи	υIII	v a I		A 2 II	
			2 4 5					250					255		

ctg ccc att	gtg gag	свв ссв	g t c	t g c	a a g	gac	t c c	асс	C g g	a t c	C g C	816
Leu Pro Ile	V a l G l u 2 6 0	Arg Pro	V a I	C y s 2 6 5	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg 270	lle	Arg	
atc act gac												8 6 4
lle Thr Asp 275	Asn Met	Phe Cys	A 1 a 2 8 0	Gly	Tyr	Lys	Pro	A s p 2 8 5	Glu	Gly	Lys	
cga ggg gat	gcc tgt	gaa gct	gac	ggg	ggg	gga	$c \; c \; c$	t t t	$g\ t\ c$	a t g	a a g	9 1 2
Arg Gly Asp 290	Ala Cys	Glu Ala 295	Asp	G 1 y	G 1 y	Gly	Pro 300	Phe	V a l	Met	Lуs	
agc ccc ttt												9 6 0
Ser Pro Phe 305	Asn Asn	Arg Trp 310	Туг	Gln	Met	G I y 3 1 5	He	Val	Ser	Trp	G 1 y 3 2 0	
gaa ggc tgt												1 0 0 8
Glu Gly Cys	Asp Arg 325	Asp Gly	Lys		G I y 3 3 0	Phe	Tyr	Thr	His	V a I 3 3 5	Phe	
cgc ctg aag											t a g	1056
Arg Leu Lys	Lys Irp 340	lle GIn	Lys	V a I 3 4 5	He	Asp	GIn	Phe	G I y 3 5 0	Glu		
	0 1 0			070					000			
< 2 1 0 > 2 8												
<211> 351												
< 2 1 2 > PRT												
< 2 1 3 > Homo	sapiens											
< 4 0 0 > 2 8												
Met Ala His		Gly Leu	Gln			Gly	Cys	L e u	Ala		Ala	
Met Ala His l Ala Leu Cys	5 Ser Leu	Val His	Ser	Gln	10 His	V a l	P h e	Leu	Ala	15 Pro		
Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg	5 Ser Leu 20	Val His	Ser Arg	G 1 n 2 5	10 His	V a l	Phe	Leu Ala	A 1 a 3 0	15 Pro	Gln	
Met Ala His l Ala Leu Cys	Ser Leu 20 Ser Leu	Val His Leu Gln	Ser Arg 40	G 1 n 2 5 V a 1	l0 His	Val Arg	Phe Thr	L e u A 1 a 4 5	A 1 a 3 0 T h r	15 Pro Ser	Gln Glu	
Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe	Val His Leu Gln Asn Pro 55	Ser Arg 40 Arg	Gln 25 Val Thr	10 His Arg Phe	Val Arg Gly	Phe Thr Ser 60	Leu Ala 45 Gly	Ala 30 Thr	15 Pro Ser Ala	Gln Glu Asp	
Met Ala His Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe	Ser Arg 40 Arg	Gln 25 Val Thr	10 His Arg Phe	Val Arg Gly Ser	Phe Thr Ser 60	Leu Ala 45 Gly	Ala 30 Thr	15 Pro Ser Ala	Gln Glu Asp Thr	
Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70	Ser Arg 40 Arg Glu	Gln 25 Val Thr	10 His Arg Phe Lys	Val Arg Gly Ser	Phe Thr Ser 60 Leu	Leu Ala 45 Gly	Ala 30 Thr Glu	15 Pro Ser Ala Lys	G 1 n G 1 u A s p T h r 8 0	
Met Ala His Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Leu	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70	Ser Arg 40 Arg Glu	Gln 25 Val Thr Lys	10 His Arg Phe Lys	Val Arg Gly Ser	Phe Thr Ser 60 Leu	Leu Ala 45 Gly	Ala 30 Thr Glu	15 Pro Ser Ala Lys Glu	G 1 n G 1 u A s p T h r 8 0	
Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Leu 85 Glu lle	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr	Gln 25 Val Thr Lys Ile	10 His Arg Phe Lys Asp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu	Ala 30 Thr Glu Asp Val	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95	Gln Glu Asp Thr 80 Gly	
Met Ala His Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu	5 Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu 85 Glu lle 100	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser Gly Met	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser	Gln 25 Val Thr Lys Ile Pro 105	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu Ile	A 1 a 3 0 T h r G 1 u A s p V a 1 L e u 1 1 0	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly	
Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu Ser Asp Ala Lys Ser Pro	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Eeu 85 Glu lle 100 Gln Glu	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser Gly Met Leu Leu	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120	Gln 25 Val Thr Lys Ile Pro 105 Gly	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg	
Met Ala His Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu Ser Asp Ala Lys Ser Pro 115 Trp Val Leu 130 Asn Phe Thr	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu 85 Glu lle 100 Gln Glu Thr Ala	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser Gly Met Leu Leu Ala His 135 Asp Leu	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120 Cys	Gln 25 Val Thr Lys Ile Pro 105 Gly Leu	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp Ala Leu	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser Tyr	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val Leu Pro 140	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125 Pro	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe Asp	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg Lys	
Met Ala His Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu Ser Asp Ala Lys Ser Pro 115 Trp Val Leu 130 Asn Phe Thr	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu 85 Glu lle 100 Gln Glu Thr Ala Glu Asn	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser Gly Met Leu Leu Ala His 135 Asp Leu 150	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120 Cys Leu	Gln 25 Val Thr Lys Ile Pro 105 Gly Leu Val	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp Ala Leu	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser Tyr	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val Leu Pro 140 Gly	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125 Pro	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser Trp His	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe Asp	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg Lys Arg 160	
Met Ala His Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu Ser Asp Ala Lys Ser Pro 115 Trp Val Leu 130 Asn Phe Thr 145 Thr Arg Tyr	Ser 5 Ser Leu 20 Leu Ber Phe Arg Pro Leu 85 Glu Ile 100 Glu Thr Ala Glu Arg 165	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser Gly Met Leu Leu Ala His 135 Asp Leu 150 Asn Ile	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120 Cys Leu Glu	Gln 25 Val Thr Lys Ile Pro 105 Gly Leu Val	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp Ala Leu Arg	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser Tyr Ile 155 Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val Leu Pro 140 Gly	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125 Pro Lys Leu	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser Trp His	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe Asp Ser Lys 175	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg Lys Arg 160 Ile	
Met Ala His Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu Ser Asp Ala Lys Ser Pro 115 Trp Val Leu 130 Asn Phe Thr	Ser 5 Ser Leu 20 Leu Ber Phe Arg Pro Leu 85 Glu Ile 100 Glu Thr Ala Glu Arg 165	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser Gly Met Leu Leu Ala His 135 Asp Leu 150 Asn Ile	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120 Cys Leu Glu	Gln 25 Val Thr Lys Ile Pro 105 Gly Leu Val	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp Ala Leu Arg	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser Tyr Ile 155 Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val Leu Pro 140 Gly	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125 Pro Lys Leu	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser Trp His	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe Asp Ser Lys 175	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg Lys Arg 160 Ile	

```
195
                            200
                                                 205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
    2 1 0
                                             220
                        2 1 5
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                    2 3 0
                                        2 3 5
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                     250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260 265
                                                     270
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        275
                            280
                                                285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Gly Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                        2 9 5
                                             3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                   3 1 0
                                3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                                    3 3 0
                3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                 3 4 5
                                                     350
< 2 1 0 > 2 9
< 211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
< 2 2 2 >
      (1)...(1056)
< 2 2 3 >
< 4 0 0 > 2 9
                                                                      48
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                    1 0
                                                                        96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                                 25
            20
                                                     3.0
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                       1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
        35
                            4 0
                                                 45
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                       192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    5 0
                       5 5
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                       2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                    70
65
                                         75
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                       288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                85
                                     90
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
                                                                       3 3 6
```

Ser	Asp	Ala	Glu	I I e	G I y	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	V a l	Met	Leu	P h e	Arg	
			1 0 0					105					1 1 0			
												a t c				3 8 4
Lуs	Ser		Gln	Glu	Leu	Leu		Gly	Ala	Ser	Leu	I I e	Ser	Asp	Arg	
		115					1 2 0	4	,			1 2 5				4.0.0
		ctc												gac		4 3 2
irp	v a 1 1 3 0	Leu	ınr	AIa	AIa	H 1 S	CYS	Leu	Leu	ıyr	140	Pro	irp	ASP	LÿS	
аас	t t c	асс	gag	a a t	gac	ctt	c t g	g t g	c g c	a t t	ggc	a a g	сас	$t\ c\ c$	c g c	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	V a l	Arg	I I e	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
1 4 5					150					155					160	
аcа	agg	t a c	gag	сва	a a c	a t t	gaa	g a a	a t a	t c c	a t g	t t g	g a a	aag	a t c	5 2 8
Thr	Arg	Туr	Glu		Asn	lle	Glu	Glu		Ser	Met	L e u	Glu		Ilе	
				165					170					175		
												gac		a a c		5 7 6
Туr	Пе	His		Arg	Tyr	Asn	Trp		Glu	Asn	Leu	Asp		Asn	Пе	
		,	180	,				185					1 9 0			0.0.4
-	-			ctg										att		6 2 4
AIa	Leu		LУS	Leu	Lÿs	LÿS		v a i	AIa	Pne	S e r	Asp	IУr	1 I e	HIS	
0.0 +		195	. +			0 " "	200		" • •		0	205		0.0.0	# a t	£ 7 0
												ttg				6 7 2
110	210	C 3 2	Leu	110	A 2 h	215	GIU	1 11 1	AIa	AIa	220	Leu	Leu	GIII	Ald	
σσα		220	σσσ	C 0 0	σtσ		g g c	tσσ	o o c	220		aag	σασ	2 C G	tσσ	7 2 0
												Lys				120
2 2 5	.,.	Бјб	01,	1116	2 3 0		01,	I I p	01,	2 3 5	Боч	Бјб	oru		2 4 0	
	gcc	аас	gtt	ggt		ggg	сад	ссс	a g t		ctg	сав	gtg	gtg	a a c	768
												Gln			Asn	
				2 4 5	•	•			250					255		
ctg	ссс	a t t	gtg	gag	Сдд	ССВ	g t c	t g c	aag	gac	t c c	асс	Сдд	a t c	С g С	8 1 6
Leu	Pro	I 1 e	V a l	Glu	Arg	Pro	V a l	Суs	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	I 1 e	Arg	
			260					265					270			
a t c	$a\mathrel{c} t$	gac	a a c	a t g	t t c	t g t	$\mathfrak{g} \ \mathfrak{c} \ \mathfrak{t}$	g g t	t a c	a a g	$c\ c\ t$	$g\ a\ t$	g a a	ggg	a a a	8 6 4
Пе	Thr	Asp	Asn	Met	P h e	Суѕ	Ala	Gly	Туr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		2 7 5					280					285				
сва												ttt				9 1 2
Arg		Asp	Ala	Суѕ	Glu		Asp	Ala	Gly	Gly		P h e	Val	Met	Lys	
	290					295			,		3 0 0			,		0.00
												gtc				960
	Pro	r n e	Asn	Asn		irp	ı y r	GIN	мет		I I e	Val	S e r	irp	Gly	
3 0 5		+ ~ +		0 4 4	3 1 0		0.0.0	t o t		3 1 5	+ 0 0	0.00	a a t	a + a	3 2 0	1 0 0 0
												aca Thr		g t g V a l	t t c	1008
υιU	σIÿ	∨ ⅓ 5	чэh	3 2 5	Λγþ	JI J	гір	1) 1	330	1 11 6	1) 1	1 11 1	11 1 2	3 3 5	1116	
												t t t			t a g	1 0 5 6
Arg	Leu	Lys		Trp	Ilе	Gln	Lys		Пlе	Asp	Gln	P h e		Glu		
			3 4 0					3 4 5					350			

<400> 30 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala 5 1 0 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln 25 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu 35 4 0 45 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr 65 7.0 75 8 0 Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly 8 5 90 Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg 105 100 Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg 1 2 0 115 125 Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys 1 3 5 1 4 0 Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg 1 5 0 155 Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Glu Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile 165 170 Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asn Ile 180 185 190 Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His 200 205 Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala 2 1 0 2 1 5 2 2 0 Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp 2 3 0 2 3 5 Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn 2 4 5 250 Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg 260 265 lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys 275 280 285 Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys 295 3 0 0 Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly 3 1 0 3 1 5 Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe 330 3 2 5 Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu 3 4 0 350 3 4 5

```
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
\langle 2 \ 2 \ 2 \rangle (1).. (1056)
<223>
< 4 0 0 > 3 1
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                 48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5
                                                                  96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                              2 5
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                 144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
       35
                          4 0
                                             45
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                 192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                      5 5
                                          60
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                 2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
               7 0 7 5
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                  288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr lle Asp Gly Arg lle Val Glu Gly
               8 5
                                  9 0
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
                                                                 3 3 6
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
               105
   1 0 0
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
                                                                 384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
           1 2 0
tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag
                                                                 4 3 2
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                      1 3 5
                                         1 4 0
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc
                                                                 480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
1 4 5
   1 5 0
                      155
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc
                                                                 5 2 8
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
              165 170 175
                                                                  5 7 6
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
           180
                              185
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac
                                                                 624
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                          200
       195
                                             205
cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct
                                                                 672
```

Pro Val Cys 210	Leu	Pro	Asp	Arg 215	Glu	Thr	Ala	Ala	S e r 2 2 0	Leu	Leu	Gln	Ala	
gga tac aag	ggg	Сдд	g t g	аса	ggC	t g g	ggC	аас	ctg	aag	gag	асв	t g g	720
Gly Tyr Lys														
2 2 5			2 3 0					2 3 5					2 4 0	
aca gcc aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ССС	a g t	gtc	ctg	сав	gtg	gtg	аас	768
Thr Ala Asn														
		2 4 5	·				250					255		
ctg ccc att	gtg	gag	сдд	ССВ	gtc	t g c	aag	gac	t c c	асс	Сдд	a t c	СВС	8 1 6
Leu Pro Ile														
	260					265					270			
atc act gac	аас	atg	t t c	t g t	g c t	g g t	t a c	aag	cct	gat	gaa	ggg	a a a	864
lle Thr Asp														
2 7 5				·	280	·	·	·		285		•	•	
cga ggg gat	gcc	t g t	gaa	gct		a g t	ggg	gga	ССС		gtc	a t g	aag	9 1 2
Arg Gly Asp														
290		·		295	-				3 0 0				•	
agc ccc ttt	аас	аас	СВС	t g g	t a t	саа	a t g	ggc	a t c	gtc	t c a	tgg	ggt	960
Ser Pro Phe														
3 0 5			3 1 0	•				3 1 5					3 2 0	
gaa ggc tgt	gac	Сдд		ggg	a a a	t a t	ggc		t a c	аса	cat	gtg		1008
Glu Gly Cys														
, ,		3 2 5	-	·	·	·	3 3 0		·			3 3 5		
cgc ctg aag	aag	t g g	a t a	сав	aag	gtc	a t t	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056
Arg Leu Lys													-	
	3 4 0					3 4 5					3 5 0			
	3 4 0					3 4 5					350			
<210> 32	3 4 0					3 4 5					350			
<210> 32 <211> 351	3 4 0					3 4 5					350			
	3 4 0					3 4 5					350			
< 2 1 1 > 3 5 1		e n s				3 4 5					350			
<211> 351 <212> PRT <213> Homo		ens				3 4 5					3 5 0			
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32</pre>	sapi				0.1		n		0					
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His</pre>	sapi	Arg	G l y	Leu	Gln			G I y	Суѕ	Leu			Ala	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1</pre>	s a p i	Arg 5				Leu	1 0				Ala	15		
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His</pre>	sapi Val Ser	Arg 5				Leu Gln	1 0				Ala Ala	15		
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys</pre>	s a p i V a l S e r 2 0	Arg 5 Leu	V a l	His	Ser	L e u G 1 n 2 5	l 0 H i s	V a l	P h e	Leu	A 1 a A 1 a 3 0	15 Pro	Gln	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	s a p i V a l S e r 2 0	Arg 5 Leu	V a l	His	Ser Arg	L e u G 1 n 2 5	l 0 H i s	V a l	P h e	L e u A l a	A 1 a A 1 a 3 0	15 Pro	Gln	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35</pre>	s a p i V a l S e r 2 0 S e r	Arg 5 Leu Leu	V a l L e u	His Gln	Ser Arg 40	L e u G l n 2 5 V a l	10 His Arg	V a l A r g	Phe Thr	L e u A 1 a 4 5	A 1 a A 1 a 3 0 T h r	15 Pro Ser	Gln Glu	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr</pre>	s a p i V a l S e r 2 0 S e r	Arg 5 Leu Leu	V a l L e u	His Gln Pro	Ser Arg 40	L e u G l n 2 5 V a l	10 His Arg	V a l A r g	Phe Thr Ser	Leu Ala 45	A 1 a A 1 a 3 0 T h r	15 Pro Ser	Gln Glu	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50</pre>	s a p i V a l S e r 2 0 S e r	Arg 5 Leu Leu Phe	V a l L e u A s n	His Gln Pro 55	Ser Arg 40 Arg	Leu Gln 25 Val	l 0 H i s A r g P h e	Val Arg Gly	Phe Thr Ser 60	Leu Ala 45 Gly	Ala Ala 30 Thr	15 Pro Ser Ala	Gln Glu Asp	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu</pre>	s a p i V a l S e r 2 0 S e r	Arg 5 Leu Leu Phe	Val Leu Asn Leu	His Gln Pro 55	Ser Arg 40 Arg	Leu Gln 25 Val	l 0 H i s A r g P h e	Val Arg Gly Ser	Phe Thr Ser 60	Leu Ala 45 Gly	Ala Ala 30 Thr	15 Pro Ser Ala	Gln Glu Asp Thr	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	sapi Val Ser 20 Ser Phe	Arg 5 Leu Leu Phe	Val Leu Asn Leu 70	His Gln Pro 55 Phe	Ser Arg 40 Arg Glu	Leu Gln 25 Val Thr	10 His Arg Phe Lys	Val Arg Gly Ser 75	Phe Thr Ser 60 Leu	Leu Ala 45 Gly	Ala Ala 30 Thr Glu Asp	15 Pro Ser Ala Lys	G 1 n G 1 u A s p T h r 8 0	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu</pre>	sapi Val Ser 20 Ser Phe	Arg 5 Leu Leu Phe Pro	Val Leu Asn Leu 70	His Gln Pro 55 Phe	Ser Arg 40 Arg Glu	Leu Gln 25 Val Thr	1 0 H i s A r g P h e L y s A s p	Val Arg Gly Ser 75	Phe Thr Ser 60 Leu	Leu Ala 45 Gly	Ala Ala 30 Thr Glu Asp	15 Pro Ser Ala Lys Glu	G 1 n G 1 u A s p T h r 8 0	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	sapi Val Ser 20 Ser Phe Arg	Arg 5 Leu Phe Pro Leu 85	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr	L e u G l n 2 5 V a l Th r L y s I l e	10 His Arg Phe Lys Asp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu	Ala Ala 30 Thr Glu Asp	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95	G 1 n G 1 u A s p T h r 8 0 G 1 y	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	sapi Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu	Arg 5 Leu Phe Pro Leu 85	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr	Leu Gln 25 Val Thr Lys Ile Pro	10 His Arg Phe Lys Asp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu	A 1 a A 1 a 3 0 T h r G 1 u A s p V a 1 L e u	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95	G 1 n G 1 u A s p T h r 8 0 G 1 y	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	sapi Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100	Arg 5 Leu Phe Pro Leu 85	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser	L e u G 1 n 2 5 V a 1 Thr L y s I 1 e Pro 1 0 5	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met	A 1 a A 1 a 3 0 Thr G 1 u A s p V a 1 L e u 1 1 0	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly	
<211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu Ser Asp Ala Lys Ser Pro	sapi Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100	Arg 5 Leu Phe Pro Leu 85	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys	L e u G l n 2 5 V a l Th r L y s I l e P r o 1 0 5	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met	A 1 a A 1 a 3 0 Thr G 1 u A s p V a 1 L e u 1 1 0	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	sapi Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln	Arg 5 Leu Phe Pro Leu 85 Ile Glu	Val Leu Asn Leu 70 Glu Leu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met Leu	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120	L e u G l n 2 5 V a l T h r L y s I l e P r o 1 0 5 G l y	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125	Ala Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg	

```
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
1 4 5
                    150
                                        155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                   170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
           180
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                            200
                                                 2 0 5
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
    2 1 0
                        2 1 5
                                             2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                                        235
                    230
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                    250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                265
                                                     270
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        275
                            280
                                                 285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
    290
                        295
                                             300
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                    3 1 0
                                        3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                3 4 5
                                                     350
< 2 1 0 > 3 3
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
\langle 2 \ 2 \ 2 \rangle (1).. (1056)
< 2 2 3 >
< 4 0 0 >
       3 3
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                      48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                   1 0
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                       96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            20
                                25
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                      1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                            4 0
                                                 4 5
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                      192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
```

1 3 5

1 4 0

	5 0					5 5					6 0					
t g t		ctg	c g a	c c t	ctg		gag	аад	аад	t c g		gag	gac	ааа	a c c	2 4 0
				Pro											Thr	2
6 5	·				7 0			·		7 5					8 0	
gaa	a g a	gag	\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{c}	c t g	gaa	t c c	t a c	a t c	gac	ggg	свс	a t t	g t g	gag	ggc	288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Туr	I 1 e	A s p	Gly	Arg	lle	V a l	Glu	Gly	
				8 5					9 0					9 5		
tcg	$g\ a\ t$	gca	gag	a t c	ggc	a t g	$t\ c\ a$	$c\ c\ t$	t g g	cag	g t g	a t g	$c\ t\ t$	t t c	C g g	3 3 6
Ser	Asp	Ala		Пe	Gly	Met	Ser		Trp	Gln	V a l	Met		P h e	Arg	
			1 0 0					1 0 5					110			2.0.1
aag				gag									ag t	gac		3 8 4
Lys	Ser		GIn	Glu	Leu	Leu		GIY	Ala	Ser	Leu		Ser	Asp	Arg	
t a a	a t c	115	0.00	a c c	a e e	a c c	120	c t c	c t a	tac	c c a	125	t a a	a a c	0 0 0	4 3 2
				g c c A l a												402
111	130	Lcu	1 11 1	11 1 a	πια	135	∪ 1 3	LCu	ьсu	1 , 1	140	110	111	изр	Гјэ	
аас		асс	gag	a a t	gac		ctg	gtg	свс	a t t		aag	сас	t c c	свс	480
				Asn												
145					150					155					160	
аса	agg	t a c	gag	сва	аас	a t t	gaa	aag	a t a	$t\ c\ c$	a t g	t t g	gaa	a a g	a t c	5 2 8
Thr	Arg	Туr	Glu	Arg	Asn	I 1 e	Glu	Lys	Ilе	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ilе	
				165					170					175		
				agg										g a c		5 7 6
Туr	Пе	His		Arg	Туr	Asn	Trp		Glu	Asn	Leu	Asp		Asp	Ilе	
			180	4				185					190			0.0.4
				ctg										att		6 2 4
AIa	Leu	ме t 195	Lys	Leu	Lys	Lys		vai	Ala	rne	Ser		I y r	1 1 e	HIS	
cct	gtg		cta	ССС	a a c	200	200	2 C 0	o c a	a c c	200	205	ctc	can	a c t	672
				Pro												0 1 2
110	2 1 0	0,5	Бои	110	пор	2 1 5	014		71 1 0	711 0	2 2 0	Бой	Бой	0111	71 1 4	
gga		aag	ggg	Сдд	gtg	аса	ggc	tgg	ggc	аас		aag	gag	a c g	t g g	7 2 0
Gly				Arg												
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0	
аса	gcc	аас	g t t	g g t	a a g	ggg	c a g	$c\ c\ c$	a g t	g t c	c t g	cag	g t g	g t g	аас	768
Thr	Ala	Asn	V a l	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro		V a l	Leu	Gln	V a l		Asn	
				2 4 5					250					255		
				gag											CgC	8 1 6
Leu	Pro	I I e		Glu	Arg	Pro	V a I		Lys	Asp	Ser	lhr		Пlе	Arg	
o t o	0 0 t		260	o t a	+ + 0	+ a +	a o t	265	t 0 0	0 0 0	0.0 t	a o t	270		0.00	0 6 1
				atg Met												8 6 4
116	1 11 1	275	V 2 II	MET	1 11 6	0) 5	280	GIJ	1) 1	ГЪЗ	110	285	υıu	Uly	ГЭЗ	
c g a	ggg		gcc	t g t	gaa	ggg		ggg	ggg	gga	ССС		gtc	atg	aag	9 1 2
Arg				Суѕ												v 1 2
- 0	290	- F	- +	* *	- **	295	- r	- •	- •	- •	3 0 0	*			• •	
a g c		t t t	аас	аас	свс		t a t	саа	a t g	ggc		g t c	t c a	t g g	g g t	960
Ser	P r o	P h e	Asn	Asn	Arg	Trp	Туr	Gln	Met	Gly	Пe	V a l	Ser	Trp	Gly	
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0	
g a a	ggc	t g t	g a c	свв	g a t	ggg	a a a	t a t	ggC	t t c	t a c	a c a	c a t	g t g	t t c	1008

```
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                3 2 5
                      3 3 0
cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag 1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                 3 4 5
< 2 1 0 > 3 4
<211> 351
<212>
      PRT
<213> Homo sapiens
< 4 0 0 >
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                                     10
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                                 25
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
        35
                            4 0
                                                 45
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                        55
                                             60
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                   7 0
                                         75
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                85
                                     90
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            1 0 0
                                105
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
                            1 2 0
        115
                                                 1 2 5
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                        1 3 5
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
1 4 5
                    150
                                         155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                    170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
                     185
           180
                                                     190
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr lle His
                             200
                                                 205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
    2 1 0
                        2 1 5
                                             2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                    2 3 0
                                         235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                     250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                 265
                                                     270
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
                             280
        2 7 5
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Gly Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
```

295

```
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305
                    3 1 0
                        3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                3 2 5
                        3 3 0
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                3 4 5
                                                    350
< 2 1 0 > 3 5
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
\langle 2 \ 2 \ 2 \rangle (1).. (1056)
< 2 2 3 >
<400> 35
                                                                     48
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                   1 ()
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                      96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            20
                                25
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                     1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                           40
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                     192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                        55
                                            6 0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                     2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
               7 0
                               7 5
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                     288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                85
                                    9 0
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
                                                                     336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
                                105
            1 0 0
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
                                                                     384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
              1 2 0
tgg gtc ctc acc gcc gcc tcc tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag
                                                                     4 3 2
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ser Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                    1 3 5
                                            1 4 0
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc
                                                                     480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                   150
                                        155
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc
                                                                     5 2 8
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
```

				165					1.7.0					175		
4				165	4		4		170		. 4			175		F 7 C
	atc c															5 7 6
IУГ	Ile H	115	180	Arg	IУГ	ASII	110	Arg 185	ъгu	ASII	Leu	ASP	Arg 190	Asp	116	
a c c	ctg a	tσ		c t a	2 2 0	220	cct		a c c	ttc	a or t	gac		a t t	C 2 C	6 2 4
						Lys										0 4 1
ΑΙα		95	ГЪЗ	Leu	ГЪЭ	ГЪЗ	200	v a i	πια	Inc	261	205	1) 1	116	11 1 2	
cct			cto	C	026	agg		2 C G	a c a	a c c	a g c		ctc	сав	a c t	672
	Val C											Leu				012
110	210	13	ьси	110	лэр	215	Ulu	1 11 1	πια	ЛΙα	220	Lси	Lси	0111	ΑΙα	
gga		2 g	σσσ	roo	σtσ	a c a	ggr	tσσ	ggr	226		aag	σασ	a c g	tσσ	7 2 0
	Tyr L															120
2 2 5	1) 1 L	, , ,	013	11 1 5	2 3 0	1 11 1	01)	11 p	013	235	Lсu	Εβο	oru	1 11 1	2 4 0	
	g c c a	a c	g t t	g g t		ggg	caσ	C	a ø t		ctø	cag	o t o	g t g		768
	Ala A															700
1 11 1	nia n	1 2 11	v a 1	245	гјэ	013	0111	110	250	v a i	Lсu	0111	* a 1	255	11 5 11	
cto	ссс а	t t	σtσ		r o o	C C G	g t c	t a c		σας	tcc	200	C G G	a t c	C G C	8 1 6
	Pro I															010
ьси	1101	1 0	260	oru	11 1 5	110	ν α I	265	Бјо	изр	501	1 11 1	270	110	11 1 8	
a t c	act g	ас		a t g	t t c	t ø t	g c t		tac	aag	cct	gat		ggg	2 2 2	8 6 4
	Thr A															001
		75	71 0 11	111 0 0	1 11 0	ە ر ₀	280	0.,	.,.	Бјо		285	014	01,	Б,б	
сва			g C C	t g t	gaa	ggg		8 C C	g g g	gga	ССС		gtc	atg	аад	9 1 2
Arg	Gly A											Phe				012
711 0	290	ГОР		0,5	014	295	11 5 р	71 T W	V.,	V.,	3 0 0	0		11100	2,0	
agc	ccc t	t t	aac	аас	C g C		t a t	саа	atg	ggc		gtc	t c a	t g g	g g t	960
	Pro P															
3 0 5					3 1 0		- , -			3 1 5					3 2 0	
	ggc t	g t	gac	Сдд		ggg	a a a	tat	ggc		t a c	аса	cat	gtg		1008
	Gly C															
	•			3 2 5			•	•	3 3 0		•			3 3 5		
С g С	ctg a	ag	aag	tgg	a t a	cag	aag	gtc	a t t	gat	сав	ttt	gga	gag	t a g	1056
	Leu L															
			3 4 0					3 4 5					3 5 0			
< 21) > 36															
< 21	1 > 35	1														
< 2 1 3	2 > PR	T														
< 213	3> H o	m 0	sapi	iens												
< 4 0 () > 36															
Met	Ala H	lis	V a l	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Суs	Leu	Ala	L e u	Ala	
1				5					1 0					15		
Ala	Leu C	уѕ	Ser	Leu	V a l	His	Ser	Gln	His	V a l	P h e	L e u	Ala	Pro	Gln	
			2 0					2 5					3 0			
Gln	Ala A		Ser	Leu	Leu	Gln		Val	Arg	Arg	Thr		Thr	Ser	Glu	
		5					4 0					4 5				
Туr	Gln T	`h r	Phe	P h e	Asn		Arg	Thr	Phe	Gly		Gly	Glu	Ala	Asp	
	5 0					5 5					6 0					

Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr

```
65
                    7.0
                                         7 5
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                85
                                     90
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            1 0 0
                                 105
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
        115
                            1 2 0
                                                 1 2 5
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ser Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                       135
                                             1 4 0
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                   150
                                     155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                    170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
                         185
           180
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr lle His
                             200
       195
                                                  205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                         2 1 5
    2 1 0
                                              2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
225
                    230
                                         2 3 5
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                     250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                 265
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        275
                             280
                                                  285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                       295
                                              3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                    3 1 0
                                        3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                         3 3 0
                3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
                                 3 4 5
                                                      350
            3 4 0
<210> 37
<211>
      1056
<212> DNA
<213>
      Homo sapiens
< 2 2 0 >
       CDS
< 2 2 1 >
< 2 2 2 >
       (1)...(1056)
< 2 2 3 >
< 4 0 0 > 3 7
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
```

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala

1 0

5

1

				ctt												9 6
Ala	Leu	Суѕ		Leu	V a I	His	Ser		His	V a I	P h e	Leu		Pro	GIn	
			2 0					2 5					3 0			
				ctg												1 4 4
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr		Thr	Ser	Glu	
		3 5					4 0					4 5				
t a c	cag	a c t	t t c	t t c	a a t	C C g	agg	acc	t t t	ggC	t c g	gga	gag	g c a	gac	192
Туr	Gln	Thr	P h e	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	P h e	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	5 0					5 5					6 0					
t g t	ggg	c t g	сва	$c\ c\ t$	c t g	t t c	gag	aag	aag	tcg	$\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{g}$	gag	gac	a a a	асс	2 4 0
Суѕ	G 1 y	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
6 5					70					75					8 0	
gaa	a g a	gag	\mathfrak{c} t \mathfrak{c}	ctg	gaa	$t\ c\ c$	t a c	a t c	gac	ggg	CgC	a t t	g t g	gag	ggc	288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Туr	Ιlе	Asp	Gly	Arg	Ιlе	Val	Glu	Gly	
				8 5					9 0					95		
t c g	gat	gca	gag	a t c	ggc	a t g	$t\ c\ a$	c c t	t g g	сав	g t g	a t g	ctt	t t c	Сдд	3 3 6
Ser	Asp	Ala	Glu	Пlе	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	V a l	Met	Leu	Phe	Arg	
			100					105					110			
aag	a g t	ССС	сав	gag	ctg	c t g	t g t	ggg	gcc	a g c	ctc	a t c	a g t	gac	свс	3 8 4
				Glu												
		115					120					1 2 5				
t g g	gtc	ctc	асс	gcc	gcc	gcc	t g c	ctc	ctg	t a c	ссв	ссс	t g g	gac	aag	4 3 2
				Ala												
-	1 3 0					1 3 5	·			·	1 4 0					
аас	t t c	асс	gag	a a t	gac	ctt	ctg	gtg	СВС	a t t	ggc	aag	сас	t c c	свс	480
				Asn												
145					150				, i	155	·	·			160	
	agg	t a c	gag	сва	аас	a t t	gaa	gag	a t a	t c c	atg	t t g	gaa	aag	a t c	5 2 8
				Arg												
				165					170					175		
t a c	a t c	сас	ССС	agg	t a c	аас	tgg	Сдд		аас	ctg	gac	сдд		a t t	5 7 6
				Arg												
			180					185					190			
gcc	c t g	a t g		ctg	aag	aag	c c t		gcc	t t c	a g t	gac		a t t	сас	6 2 4
				Leu												
		195	- •		- •	- •	200					205	•			
c c t	gtg		ctg	ссс	gac	agg		ася	g c a	gcc	agc		ctc	сая	gct	672
				Pro												· · · -
	2 1 0	0,2	200		р	215	• • •				2 2 0	204	204	• • • •		
gga		aag	ggg	сдд	gtg		ggc	t g g	ggc	аас		aag	gag	асв	t g g	720
				Arg												
2 2 5	- , 1	_ , 5	~ • J	0	2 3 0		J	p	~ · J	235	_ v u	_ , 5	Ç. u		2 4 0	
	g c c	аас	g t t	g g t		ggg	cag	ccc	a g t		ctg	cag	gtg	g t g	a a c	768
				Gly												1 V V
. 11 1	11 I U	11 0 11	. u 1	245	ננם	01)	V 1 11		250	. u 1	L∨u	J 1 11	, u 1	255	11 A II	
c t o	ccc	att	gto	gag	Caa	C C a	gtc	t ø c		gar	trr	acc	Caa		cor	8 1 6
				Glu												V 1 V
∟vu			260	Jiu	1110		. u 1	265	נום	110 h	~ · · ·	1	270		1110	
atc	act	gar		a t g	ttc	t ø t	g c t		tar	aaσ	cct	gat		ggg	ааа	8 6 4
				Met												O U I
116	1 11 1	v 2 h	U 9 II	INI C f	1 11 6	0 y S	піа	OIJ	ıyı	гіз	1 1 0	пэр	σιu	U I J	гіз	

	2 7	7 5				280					285				
сва		at gc	tgt	gaa	ggg		gcc	ggg	gga	ССС		gtc	a t g	aag	9 1 2
Arg	Gly As														
	2 9 0				295					3 0 0					
a g c	ccc t	tt aa	a a c	С g С	t g g	t a t	саа	a t g	g g C	a t c	g t c	t c a	t g g	g g t	960
Ser	Pro Pi	ne Ası	n Asn	Arg	Trp	Туr	Gln	Met	Gly	Пlе	V a l	Ser	Trp	Gly	
3 0 5				3 1 0					3 1 5					3 2 0	
g a a	ggc t	gt ga	Cgg	g a t	ggg	a a a	t a t	ggC	t t c	t a c	a c a	$c\ a\ t$	g t g	t t c	1008
Glu	Gly C	ys As ı	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	P h e	Tyr	Thr	His	V a l	Phe	
			3 2 5					3 3 0					3 3 5		
$c\ g\ c$	ctg as	ag aa{	t g g	a t a	cag	a a g	g t c	a t t	$g\ a\ t$	cag	t t t	gga	gag	t a g	1056
Arg	Leu L	ys Lys	Trp	I 1 e	Gln	Lys	V a l	lle	Asp	Gln	P h e	Gly	Glu		
		3 4 ()				3 4 5					3 5 0			
Z 0 1 (
< 2 1 (1													
< 2 1 1															
< 2 1 2															
< 2 1 3) / ПОІ	no sa p	rens												
< 4 0 ()> 38														
	Ala H	is Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	
1			5	·				1 0	·	·			15		
Ala	Leu C	ys Sei	Leu	V a l	His	Ser	Gln	His	V a l	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
		2 0					2 5					3 0			
Gln	Ala Ai	rg Sei	Leu	Leu	Gln	Arg	V a l	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
	3 5	ō				4 0					4 5				
Туr	Gln Tl	hr Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	P h e	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	5 0				5 5					6 0					
Суѕ	Gly L	eu Ara	Pro	L e u	P h e	Glu	Lys	Lys	Ser	L e u	Glu	Asp	Lys	Thr	
6 5				7 0					7 5					8 0	
Glu	Arg G	lu Lei	ı Leu	Glu	Ser	Туr	II e	Asp	Gly	Arg	Пе	V a l	Glu	Gly	
			8 5					9 0					95		
Ser	Asp A			Gly	Met	Ser		Trp	Gln	Val	Met		P h e	Arg	
	_	10(1 0 5					110			
Lys	Ser Pi		ı Glu	Leu	Leu		Gly	Ala	Ser	Leu		Ser	Asp	Arg	
_		15				1 2 0		_	_		1 2 5	_			
Trp	Val Le	eu Thi	Ala	Ala		Суѕ	Leu	Leu	Tyr		Pro	Trp	Asp	Lуs	
	130	0.1			135		17 1			1 4 0			0		
	Phe Th	nr Glu	ı Asn		Leu	Leu	V a I	Arg		Gly	Lys	His	Ser		
145	T	C 1	۸	150		C 1	C 1	Ι 1	155	M	1	C 1		160	
ınr	Arg T	yr Gil		Asn	1 1 e	GIU	GIU		ser	мет	Leu	GIU		1 1 e	
т	II o II i	: . D	165	т	100	Т.,	۸ «	170	A a n	1	100	A = «	175	Lla	
ΙΥΓ	Ile H			IУГ	ASII	111		6 I U	ASII	Lеи	ASP		ASP	116	
A 1 a	Lan Ma	180		Lua	Lua	D	185	A 1 a	Dha	C ^ *	Aan	190 Tur	Ιlα	Ціо	
AId	Leu Me		ь пеп	г й 2	гλ2	200	v d l	AId	1 11 6	Sel	205	ıyI	116	11 1 5	
D r o			1 P r A	Acn	Ara		Th.	A 1 a	A 1 a	۲ <i>،</i> ۳		Lan	C.1 n	A 1 a	
110	Val C: 210	12 FG(1 1 1 0	чэh	215	σιu	1 11 1	ліа	ліа	2 2 0	ьcu	ьcu	O I II	лια	
6.1 v	Tyr Ly	v c (-1 -	Δrσ	V a 1		C. I v	Trn	(. 1 v	Acn		Ive	(, 1 n	Thr	Trn	
2 2 5	тут Б;	JO UI	ліб	230	1 11 1	013	1 1 P	O I J	235	ьcu	гіэ	oru	1 11 1	2 4 0	
7 7 A				200					400					4 T V	

Thr	Ala	Asn	V a l	G 1 y 2 4 5	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser 250	V a l	L e u	Gln	V a l	V a 1 2 5 5	Asn	
Leu	Pro	lle	V a 1 2 6 0		Arg	Pro	V a 1	C y s 2 6 5		Asp	Ser	Thr	Arg 270		Arg	
I I e	Thr	Asp 275	Asn	Met	P h e	Суѕ	A 1 a 2 8 0	G 1 y	Tyr	Lys	Pro	A s p 2 8 5	Glu	Gly	Lys	
Arg	G I y 2 9 0	Asp	Ala	Суѕ	Glu	G 1 y 2 9 5	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro 300	P h e	Val	Met	Lys	
3 0 5		Phe			3 1 0					3 1 5					3 2 0	
		Суѕ		3 2 5					3 3 0					3 3 5	Phe	
Arg	Leu	Lys	L y s 3 4 0	Irp	116	GIN	Lys	V a I 3 4 5	He	Asp	GIN	Phe	G I y 3 5 0	GIU		
< 2 1 < 2 1 < 2 1 < 2 1 < 2 1 < 2 1	1 > 2 >	3 9 1 0 5 6 D N A H o m o	s a p i	e n s												
< 2 2 < 2 2 < 2 2 < 2 2 < 2 2	1 > 2 >	CDS (1)	(105	6)												
< 4 0	0 >	3 9														
		cac His														4 8
g c c		t g t C y s		c t t					$c \ a \ t$					$\mathfrak{c} \mathfrak{c} \mathfrak{t}$		9 6
		с g g А r g 3 5														1 4 4
		a c t T h r														192
	g g g	ctg Leu				t t c					c t g				a c c T h r 8 0	2 4 0
g a a		g a g G l u								ggg					ggC	288
		g c a A l a														3 3 6
aag Lys		c c c P r o 1 1 5														3 8 4

t g g	gto	ctc	асс	gcc	gcc	gcc	t g c	\mathfrak{c} t \mathfrak{c}	ctg	t a c	ссд	c c c	t g g	gac	aag	4 3 2
		Leu														
111			1 11 1	АГа	АГа		O y S	Lси	ьси	1) 1		1 1 0	ПP	лэр	Г 3 2	
	1 3 0					1 3 5					1 4 0					
аас	t t c	асс	gag	a a t	gac	ctt	ctg	gtg	C g C	a t t	ggc	aag	c a c	$t\;c\;c$	C g C	480
Asn	Phe	Thr	$6.1 \mathrm{n}$	Asn	Asn	I e 11	Len	Val	Arg	Πle	G 1 v	Lvc	His	Ser	Arg	
	1 11 0	1 11 1	oru	71 5 11		Бса	Бси		111 6		01,	Буб	1115			
145					150					155					160	
аса	agg	t a c	gag	сва	аас	a t t	gaa	aag	a t a	t c c	a t g	ttg	gaa	aag	a t c	5 2 8
Thr	Arg	Туr	G I n	Arg	Asn	11e	G L n	Lvs	He	Ser	Met	L. e. 11	G I n	Lvs	Пlе	
	0	.,.	0 . u	165			0 . u	2,5	170	201	o t	Воч	0 . u			
														175		
t a c	a t c	сас	$C \; C \; C$	agg	t a c	аас	tgg	C g g	gag	a a c	ctg	g a c	C g g	g a c	att	5 7 6
Туr	Ile	His	Pro	Arg	Туr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Пlе	
·			180		·		-	185				•	190	•		
																0.0.4
gcc	ctg	a t g	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	g c c	ttc	agt	gac	t a c	a t t	cac	6 2 4
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lуs	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Туr	Пlе	His	
		195					200					205				
224									" • •	# 0 0	0 " 0				~ a t	6.7.0
cct											a g c					672
Pro	Val	Суѕ	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	2 1 0					2 1 5					2 2 0					
n n o				e a a	a t a		a a c	t a a	a a c	2.2.0		2 2 4	n n n	200	+ a a	7 2 0
gga	t a c															1 2 0
Gly	Туr	Lуs	Gly	Arg	V a l	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lуs	Glu	Thr	Trp	
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0	
аса	a c c	аас	σ t t	σσt	2 2 0	σσσ	can	C C C	a o t	a t c	cto	C 2 G	a t a	a t a	аас	768
																100
Inr	Ala	Asn	vai	GIY	Lуs	GIY	GIN	Pro	Ser	v a i	Leu	GIN	v a i	Val	Asn	
				2 4 5					250					255		
ctg	ccc	a t t	gtg	gag	Cgg	CCg	gtc	t g c	aag	gac	tcc	асс	C g g	a f c	свс	8 1 6
																010
Lеи	rro	lle		GIU	Arg	110	v a i		ГЯЗ	ASP	261	Inr		116	Arg	
			260					265					270			
a t c	a c t	gac	аас	atg	ttc	tgt	gct	ggt	t a c	aag	$c\ c\ t$	gat	gaa	ggg	a a a	864
		Asp														
116	1 11 1		V 2 II	INICI	1 11 6	0 3 3		GIJ	1) 1	ГЭЗ	110		Glu	Uly	Гју	
		275					280					285				
сва	ggg	g a t	gcc	t g t	gaa	ggg	gac	gcc	ggg	gga	c c c	ttt	gtc	a t g	aag	9 1 2
		Asp														
1116			11 1 u	0 , 3	Olu		изр	71 T U	013	013		1 11 0	, a 1	IVI C C	Бјб	
	2 9 0					295					300					
a g c	c c c	ttt	аас	аас	c g c	t g g	t a t	caa	a t g	ggc	a t c	g t c	t c a	t g g	ggt	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tvr	Gln	Met	Glv	I I e	V a 1	Ser	Trn	(;] v	
3 0 5					3 1 0		- • -			3 1 5					3 2 0	
g a a	g g C	t g t	gac	C g g	gat	ggg	a a a	tat	g g C	ttc	t a c	a c a	cat	gtg	ttc	1008
Glu	Gly	Суѕ	Asp	Arg	Asp	Gly	Lуs	Туr	Gly	Phe	Туr	Thr	His	Val	Phe	
				3 2 5					3 3 0					3 3 5		
								1				111			4 -	1 0 5 0
		aag									cag				t a g	1 0 5 6
Arg	Leu	Lys	Lуs	Trp	Ιlе	Gln	Lys	Val	Ιlе	Asp	Gln	P h e	Gly	Glu		
			3 4 0					3 4 5					3 5 0			
			0 1 0					010					000			
< 21 () >	4 0														
< 2 1 1)	351														
< 2 1 2		PRT														
< 2 1 3) /	Homo	sap	iens												

1				5					1 0					15	
Ala	Leu	Суѕ	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His				Ala	Pro	Gln
			2 0										3 0		
Gln	Ala	Arg	Ser	L e u	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu
		35					4 0					4 5			
Туr	Gln	Thr	P h e	P h e	Asn	Pro	Arg	Thr	P h e	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp
	5 0					5 5					6 0				
Суѕ	Gly	L e u	Arg	Pro	Leu	P h e	Glu	Lys	Lys	Ser	L e u	Glu	Asp	Lys	Thr
6 5					70					75					8 0
Glu	Arg	Glu	L e u	L e u	Glu	Ser	Туr	Ιlе	Asp	Gly	Arg	II e	V a l	Glu	Gly
				8 5					9 0					95	
Ser	Asp	Ala						Pro	Trp	Gln	Val	Met		P h e	Arg
	_	_	100					105					110		
Lуs	Ser							Gly					Ser	Asp	Arg
		115					1 2 0					1 2 5			
Trp		Leu	Thr				Суѕ	Leu				Pro	Trp	Asp	Lуs
	130	<i>(</i> D, 1	0.1				,	17 1			1 4 0			0	
Asn	Phe	Thr						Val			Gly	Lys	His		
145	۸	т		A	150					155	М. т	τ.	C 1		160
ınr	Arg	IУr	6 I U					Lys		S e r	мет	Leu	GIU		Пlе
т	Lla	11: .	Dua	165				A		1	1	100	A == 0	175	I 1 o
ΙÿΓ	116	ПΙЗ	180	Arg	1) [ASII	111	Arg 185	GIU	ASII	Lеи	ASP	A F g	ASP	116
A 1 a	I A 11	Mat		I A 11	Lvc	Lvc	Pro	Val	A 1 a	Pha	Sar	Aen		Ilα	Ціс
ЛΙα	Ltu	195	Гјз	Lсu	Гјз	Гјз	200	v a i	ліа	1 11 6	261	205	1) 1	116	11 1 2
Pro	V a 1		I e 11	Pro	Acn	Δισ		Thr	Ala	Ala	Ser		I A 11	(. 1 n	АІа
110	2 1 0	0,3	Lcu	110	пор	215		1 11 1		A I u	2 2 0	Lсu	Lcu	OIII	A I a
Glv		Lvs	G l v	Arφ	Val			Trp		Asn		Lvs	Glu	Thr	Trn
2 2 5	.,.	Б,б	01,	711 0	2 3 0		0.,	11 p	Ů.,	2 3 5	ь ∘ u	Буб	o i u		2 4 0
	Ala	Asn	Val	Gly		Gly	Gln	Pro	Ser		Leu	Gln	V a l	Val	
				2 4 5	- •				250					255	
Leu	Pro	I 1 e	V a l		Arg	Pro	Val	Суѕ	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	I 1 e	Arg
			260					265					270		
Пе	Thr	Asp	Asn	Met	P h e	Суѕ	Ala	Gly	Туr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys
		275					280					285			
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	P h e	V a l	Met	Lys
	290					295					3 0 0				
Ser	Pro	P h e	Asn	Asn	Arg	Trp	Туr	Gln	Met	Gly	Ιlе	V a l	Ser	Trp	Gly
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0
Glu	Gly	Cys	Asp		Asp	Gly	Lys	Tyr		P h e	Tyr	Thr	His		P h e
				3 2 5					3 3 0					3 3 5	
Arg	Leu	Lуs		Trp	I 1 e	Gln	Lуs	Val	I l e	Asp	Gln	Phe		Glu	
			3 4 0					3 4 5					3 5 0		
/010		4 1													
$ \leq$ $Z \perp 0$) > -	4 1													

<210> 41

<211> 1056

< 2 1 2 > D N A

<213> Homo sapiens

<221> CDS $\langle 2 2 2 \rangle$ (1).. (1056) < 2 2 3 > < 4 0 0 > 4 1atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct 4.8 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala 5 1.0 gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag 96 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln 25 20 caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag 1 4 4 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu 4 0 35 45 tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac 192 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp 5 0 5 5 tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag tcg ctg gag gac aaa acc 2 4 0 Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr 7 0 288 gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly 8 5 90 tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg 3 3 6 Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg 1 0 0 105 aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc 384 Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg 1 1 5 120 tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag 4 3 2 Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys 130 135 aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc 480 Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg 1 4 5 150 155 aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc 528 Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile 170 165 tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gcc att 5 7 6 Tyr lle His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Ala lle 180 185 gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac 6 2 4 Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His 195 200 205 cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct 672 Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala 2 1 0 2 1 5 2 2 0 720 gga tac aag ggg cgg gtg aca ggc tgg ggc aac ctg aag gag acg tgg Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp

235

2 4 0

2 2 5

aca gcc aa Thr Ala As		y Lys Gl					gtg aac Val Asn 255	
ctg ccc at Leu Pro II	t gtg ga	g cgg cca		c aag ga s Lys As			atc cgc	
atc act ga lle Thr As 27	p Asn Me			t tac aa y Tyr Ly		p Glu	ggg aaa Gly Lys	
cga ggg ga Arg Gly As 290	t gcc tg p Ala Cy		Asp Al					
agc ccc tt Ser Pro Ph 305					y Ile Va			
gaa ggc tg Glu Gly Cy		g Asp Gl					gtg ttc Val Phe 335	
cgc ctg aa Arg Leu Ly				l lle Ası				1 0 5 6
<210> 42 <211> 351								
<212> PRT <213> Hom		S						
< 2 1 3 > Hom		S						
< 2 1 3 > Hom < 4 0 0 > 4 2 Met Ala Hi 1	o sapien s Val Ar	g Gly Lei		1 0			15	
<213> Hom <400> 42 Met Ala Hi	o sapien s Val Ar	g Gly Lei		10 n His Va			15	
< 2 1 3 > Hom < 4 0 0 > 4 2 Met Ala Hi 1	s Val Ar 5 s Ser Let 20 g Ser Let	g Gly Let u Val His	Ser G1 25	10 n His Va	l Phe Le	u Ala 30	15 Pro Gln	
<pre><213> Hom <400> 42 Met Ala Hi 1 Ala Leu Cy Gln Ala Ar</pre>	o sapien s Val Ar 5 s Ser Le 20 g Ser Le	g Gly Let u Val His u Leu Gli	Ser Gl 25 Arg Va 40	10 n His Va l Arg Ara	l Phe Le g Thr Al 45	u Ala 30 a Thr	15 Pro Gln Ser Glu	
<pre><213> Hom <400> 42 Met Ala Hi l Ala Leu Cy Gln Ala Ar 35 Tyr Gln Th</pre>	o sapien s Val Ar 5 s Ser Le 20 g Ser Le r Phe Phe	g Gly Leu u Val His u Leu Gli e Asn Pro 55	Ser Gl 25 Arg Va 40 Arg Th	10 n His Va l Arg Ara r Phe Gla	l Phe Le g Thr Al 45 y Ser Gl 60	u Ala 30 a Thr	15 Pro Gln Ser Glu Ala Asp	
<pre><213> Hom <400> 42 Met Ala Hi l Ala Leu Cy Gln Ala Ar</pre>	o sapien s Val Ar 5 s Ser Le 20 g Ser Le r Phe Phe u Arg Pre	g Gly Leu u Val His u Leu Glr e Asn Pro 55 o Leu Phe 70	Ser Gl 25 Arg Va 40 Arg Th	10 n His Va l Arg Arg r Phe Gla s Lys Se 75	Phe Le Thr Al 45 Ser Gl 60 Leu Gl	u Ala 30 a Thr y Glu u Asp	15 Pro Gln Ser Glu Ala Asp Lys Thr	
<pre><213> Hom <400> 42 Met Ala Hi l Ala Leu Cy Gln Ala Ar</pre>	o sapien s Val Ar 5 s Ser Le 20 g Ser Le r Phe Phe u Arg Pre u Leu Le 85	g Gly Leu u Val His u Leu Gli e Asn Pro 55 b Leu Pho 70 u Glu Sei	Ser Gl 25 Arg Va 40 Arg Th Glu Ly	10 n His Va l Arg Arg r Phe Gla s Lys Se 75 e Asp Gla 90 o Trp Gla	l Phe Le g Thr Al 45 y Ser Gl 60 r Leu Gl	u Ala 30 a Thr y Glu u Asp e Val	15 Pro Gln Ser Glu Ala Asp Lys Thr 80 Glu Gly 95	
<pre><213> Hom <400> 42 Met Ala Hi l Ala Leu Cy Gln Ala Ar</pre>	s Val Ar: s Val Ar: s Ser Ler 20 g Ser Ler r Phe Phe u Arg Pre u Leu Ler 85 a Glu III 100 o Gln Gli	g Gly Leu u Val His u Leu Gli e Asn Pro 55 b Leu Pho 70 u Glu Sei	Ser Gl 25 Arg Va 40 Arg Th Clu Ly Tyr Il Ser Pr 10	10 n His Va l Arg Arg r Phe Gla s Lys Se 75 e Asp Gla 90 o Trp Gla	I Phe Le g Thr Al 45 y Ser Gl 60 r Leu Gl y Arg Il n Val Me	u Ala 30 a Thr y Glu u Asp e Val t Leu 110 e Ser	15 Pro Gln Ser Glu Ala Asp Lys Thr 80 Glu Gly 95 Phe Arg	
<pre><213> Hom <400> 42 Met Ala Hi l Ala Leu Cy Gln Ala Ar 35 Tyr Gln Th 50 Cys Gly Le 65 Glu Arg Gl Ser Asp Al Lys Ser Pr</pre>	s Val Ar 5 s Ser Ler 20 g Ser Ler u Arg Pr u Leu Ler 85 a Glu Ilr 100 o Gln Glr 5	g Gly Leu u Val His u Leu Glu e Asn Pro 55 b Leu Pho 70 u Glu Seu e Gly Meu	Ser G1 25 Arg Va 40 Arg Th Glu Ly Tyr I1 Ser Pr 10 Cys G1 120 Cys Le	10 n His Va l Arg Arg r Phe Gla s Lys Se 75 e Asp Gla 90 o Trp Gla 5 y Ala Se	I Phe Le g Thr Al 45 y Ser Gl 60 r Leu Gl y Arg Il n Val Me r Leu Il 12	u Ala 30 a Thr y Glu u Asp e Val t Leu 110 e Ser 5	15 Pro Gln Ser Glu Ala Asp Lys Thr 80 Glu Gly 95 Phe Arg	
<pre><213> Hom <400> 42 Met Ala Hi l Ala Leu Cy Gln Ala Ar 35 Tyr Gln Th 50 Cys Gly Le 65 Glu Arg Gl Ser Asp Al Lys Ser Pr 11 Trp Val Le</pre>	s Val Ar s 5 s Ser Let 20 g Ser Let 4 let 4 let 4 let 4 let 5 s 5 a Glu II s 100 o Gln Glt 5 u Thr Al	g Gly Leu u Val His u Leu Glu e Asn Pro 55 c Leu Phe 70 u Glu Seu u Leu Leu a Ala His	Ser Gl 25 Arg Va 40 Arg Th Cys Gl 120 Cys Le	10 n His Va l Arg Arg r Phe Gla s Lys Se 75 e Asp Gla 90 o Trp Gla 5 y Ala Se u Leu Ty	I Phe Le g Thr Al 45 y Ser Gl 60 r Leu Gl w Arg Il n Val Me r Leu Il 12 r Pro Pr 140 e Gly Ly	u Ala 30 a Thr y Glu u Asp e Val t Leu 110 e Ser 5	15 Pro Gln Ser Glu Ala Asp Lys Thr 80 Glu Gly 95 Phe Arg Asp Lys	

```
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Ala Ile
                  185
            180
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                            200
                                                205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                        2 1 5
                                             2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                    2 3 0
                                        235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                     250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
                                 265
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        2 7 5
                            280
                                                 285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                        295
                                             3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305
                   3 1 0
                            3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                    3 3 0
                3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
                                3 4 5
                                                     350
            3 4 0
< 2 1 0 > 4 3
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
< 2 2 2 >
      (1)...(1056)
< 2 2 3 >
\langle 4 \ 0 \ 0 \rangle \qquad 4 \ 3
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                       4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                    10
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                        96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            2 0
                                 25
                                                     3 0
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                       1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
        3 5
                            4 ()
                                                                       192
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    50
                        5 5
                                             6 0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                       2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                7 0
                                        75
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                       288
```

Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tvr	I l e	Asp	G l v	Arg	I 1 e	V a l	Glu	G 1 v	
٠. ٧	0	V . u	204	85	• • •	~ 0 .			9 0	·.,	0			9 5	•••	
$t\ c\ g$	g a t	gca	gag	a t c	ggc	a t g	$t\ c\ a$	$c\ c\ t$	t g g	cag	g t g	a t g	c t t	t t c	Сдд	3 3 6
Ser	Asp	Ala	Glu	I 1 e	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	V a l	Met	L e u	P h e	Arg	
			100					105					110			
aag	a g t	$C \; C \; C$	cag	gag	$\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{g}$	$\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{g}$	t g t	ggg	gcc	a g c	\mathfrak{c} t \mathfrak{c}	a t c	a g t	gac	cg c	3 8 4
Lуs	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	L e u	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Пlе	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
t g g	g t c	\mathfrak{c} t \mathfrak{c}	асс	gcc	gcc	gcc	t g c	\mathfrak{c} t \mathfrak{c}	c t g	t a c	C C g	$C \; C \; C$	t g g	gac	aag	4 3 2
Trp	V a l	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Сус	Leu	Leu	Туr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					1 4 0					
a a c	t t c	$a\ c\ c$	gag	a a t	g a c	ctt	ctg	gtg	$c\ g\ c$	a t t	ggC	aag	cac	t c c	c g c	480
	Phe	Thr	Glu	Asn		L e u	Leu	V a l	Arg		Gly	Lys	His	Ser		
145					150					155					160	
									a t a					aag	a t c	5 2 8
Thr	Arg	Туr	Glu		Asn	Пе	Glu	Ala	Пlе	Ser	Met	Leu	Glu		Ilе	
				165					170					175		
									gag					gac	att	5 7 6
Туr	Пlе	His		Arg	Туr	Asn	Trp		Glu	Asn	Leu	Asp		Asp	lle	
			180					185					190			2.0.4
									g c c					att		6 2 4
Ala	Leu		Lys	Leu	Lys	Lys		V a I	Ala	Phe	Ser		Tyr	Пе	His	
		195					200					2 0 5				0.5.0
									gca							672
Pro		Cys	Leu	Pro	Asp		6 L u	lhr	Ala	Ala		Leu	Leu	GIN	Ala	
	2 1 0					2 1 5		1			2 2 0				1	500
									ggc				gag		tgg	7 2 0
	ıyr	Lys	GIY	Arg		ınr	GIY	irp	Gly	A s n 2 3 5	Leu	Lys	GIU	ınr	Trp	
2 2 5	* • • •				2 3 0				0 " +						2 4 0	7.00
									agt						a a c	768
1 11 1	Ala	A 2 II	V d I	245	Г } 2	UIY	GIII	110	Ser 250	V d I	Leu	GIII	V d I	V a l 2 5 5	Asn	
c t a	0.0.0	a t t	a t a		e a a	e e u	a t c	tac	aag	a a c	tcc	200	e a a	a t c	c a c	8 1 6
									Lys					lle		0 1 0
Lсu	110	116	260	Ulu	ЛІБ	110	v a i	265	Гјз	лзр	n e i	1 11 1	270	116	ЛІБ	
a t c	a c t	σας		atσ	ttc	tσt	o c t		t a c	α α σ	cct	σat		σσσ	2 2 2	864
									Tyr							0 0 1
110	1 11 1	275	71 5 11	11100	1 11 0	0,3	280	01)	. , .	Ц	110	285	oru	01,	Бју	
c g a	ggg		g C C	t g t	gaa	ggg		g c c	ggg	gga	ccc		gtc	atg	aag	9 1 2
									Gly							012
711 0	290	71 5 p	711 4	0,5	0 I u	295	11 ор	711 4	01,	01,	300	1 11 0		in o c	D , 0	
agc		ttt	аас	аас	C g C		t a t	саа	a t g	ggc		gtc	t c a	t g g	g g t	960
									Met						Gly	3 0 0
305		0			3 1 0	. • P	·		3 •	3 1 5	0			. • P	3 2 0	
gaa	ggc	t g t	gac	Сдд		ggg	a a a	tat	ggc		t a c	аса	cat	gtg	ttc	1008
									Gly						Phe	
	•		-	3 2 5	-	•			3 3 0					3 3 5		
свс	ctg	aag	aag		a t a	сав	aag	gtc	a t t	gat	сав	t t t	gga	gag	t a g	1056
									Ιlе							
			3 4 0					3 4 5					3 5 0			

```
< 2 1 0 >
       4 4
<211>
       3 5 1
< 2 1 2 >
       PRT
<213>
       Homo sapiens
< 400> 44
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                                      1.0
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                                  25
            20
                                                       30
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                             40
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                         5 5
                                              60
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                    7.0
                                          75
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                 8 5
                                      90
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            100
                                  105
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
                             120
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                        135
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                    150
                                         155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Ala Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                     170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
                                 185
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
        195
                             200
                                                  205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
    2 1 0
                         2 1 5
                                              2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
2 2 5
                     2 3 0
                                          235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                 2 4 5
                                      250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                  265
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        275
                             280
                                                  285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                         295
                                              300
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305
                     3 1 0
                                          3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                 3 2 5
                                      330
```

Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu

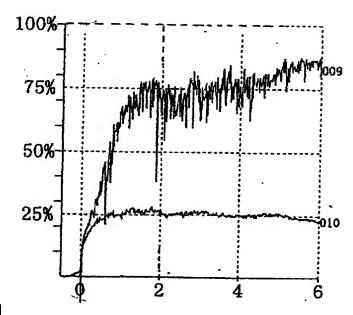
3 4 0 3 5 0

```
< 2 1 0 >
      4 5
<211>
      1056
<212>
       DNA
<213>
       Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221>
       CDS
< 2 2 2 >
       (1)...(1056)
< 2 2 3 >
< 400 > 45
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                         48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                                     1 0
                                                                          96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            20
                                 25
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                         1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                             4 0
                                                  4 5
                                                                         192
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    5.0
                         5 5
                                              6 0
                                                                         2 4 0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65
                     7.0
                                          75
                                                               8.0
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                         288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr lle Asp Gly Arg lle Val Glu Gly
                8 5
                                      90
                                                                         3 3 6
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
                                 105
                                                                         384
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu lle Ser Asp Arg
        115
                             120
                                                  1 2 5
tgg gtc ctc acc gcc gcc gcc tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag
                                                                         4 3 2
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
    130
                         135
                                              140
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc gcc cac tcc cgc
                                                                         480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Ala His Ser Arg
                     150
                                          155
1 4 5
                                                                         528
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                      170
                                                           175
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att
                                                                         576
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
            180
                                 185
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac
                                                                         624
```

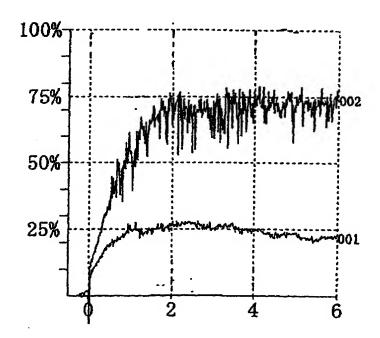
Ala	L e u	Met 195	Lys	L e u	Lys	Lys	Pro 200	V a l	Ala	P h e	Ser	Asp 205	Туr	I l e	H i s	
c c t	gtg	t g t	ctg	ССС	gac	agg	gag	асв	gca	gcc	a g c	ttg	c t c	сав	gct	672
Pro	V a l								Ala							
	2 1 0					2 1 5					2 2 0					
gga	tac	aag	ggg	Сдд	gtg		ggc	t g g	ggc	аас		aag	gag	асв	t g g	720
									Gly							
2 2 5	. , .	2,5	Ÿ.,	0	2 3 0		·		·	2 3 5	200	2,,	• • •		2 4 0	
	g C C	аас	gtt	g g t		ggg	cag	ССС	a g t		ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
									Ser						Asn	
				2 4 5	2,0	·.,	· · · ·	• • •	250		200	· · · ·		255		
ctg	ССС	a t t	gtg		Сдд	ссд	gtc	t g c	aag	gac	t c c	асс	Сдд	a t c	свс	8 1 6
									Lys					I l e		
204			260	٠. ٠	0	• • •		265	2, -	p	~ • •		270		0	
a t c	a c t	gac		a t g	t t c	tgt	g c t		t a c	aag	cct	g a t		ggg	a a a	8 6 4
									Туr							
		275					280			-,-		285			_, -	
сва	ggg	gat	gcc	t g t	gaa	ggg	gac	gcc	ggg	gga	ССС	ttt	gtc	a t g	aag	9 1 2
Arg	Gly								Gly							
	290					295					3 0 0					
agc	ссс	ttt	аас	аас	свс	tgg	t a t	саа	a t g	ggC	a t c	gtc	t c a	t g g	ggt	960
Ser	Pro								Met							
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0	
gaa	ggc	t g t	gac	Сдд	g a t	ggg	a a a	t a t	ggc	t t c	t a c	аса	cat	g t g	t t c	1008
									Gly						Phe	
				3 2 5					3 3 0					3 3 5		
С g С	ctg	aag	aag	t g g	a t a	cag	a a g	gtc	a t t	gat	cag	ttt	gga	gag	t a g	1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ιle	Gln	Lуs	Val	Ιlе	Asp	Gln	P h e	Gly	Glu		
			3 4 0					3 4 5					3 5 0			
< 2 1 () >	4 6														
< 21		351														
< 212		PRT														
< 213		Homo	sap	iens												
(21)	, ,	11 0 111 0	5 а р	10115												
< 4 0 () >	4 6														
Met	Ala	His	V a l	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Суѕ	Leu	Ala	Leu	Ala	
1				5					1 0					15		
Ala	Leu	Суѕ	Ser	Leu	V a l	His	Ser	Gln	His	Val	P h e	Leu	Ala	Pro	Gln	
			2 0					25					3 0			
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		3 5					4 0					4 5				
Туr	Gln	Thr	P h e	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	5 0					5 5					6 0					
Суѕ	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	P h e	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
6 5					7 0					7 5					8 0	
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ιlе	Asp	Gly	Arg	I 1 e	Val	Glu	Gly	
				8 5					9 0					95		
Ser	Asp	Ala	Glu	I 1 e	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	P h e	Arg	
			100					105					1 1 0			
			100													

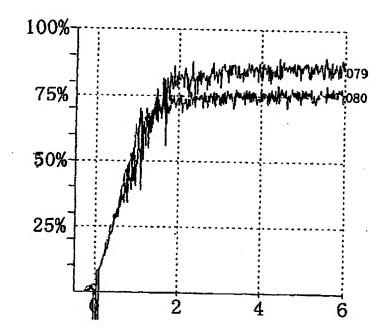
Lys	Ser	Pro 115	Gln	Glu	Leu	L e u	C y s 1 2 0	Gly		Ser	Leu	II e 125	Ser	Asp	Arg
Trp	V a l 1 3 0	Leu	Thr	Ala	Ala		Суѕ	Leu	Leu	Туr	Pro 140	Pro	Trp	Asp	Lys
Asn 145		Thr		Asn	Asp 150		Leu	V a l		IIe 155	G 1 y	Ala	H i s	Ser	Arg 160
Thr	Arg	Туr	Glu	Arg 165	Asn	I I e	Glu	Lys	I 1 e 1 7 0	Ser	Met	Leu	Glu	L y s 175	Ile
Tyr	Ile	His	Pro 180	Arg	Туr			Arg 185			Leu		Arg 190	Asp	Ile
Ala	Leu	Met 195	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro 200	V a l	Ala	P h e	Ser	A s p 2 0 5	Туr	Ile	His
Pro	V a l 2 1 0	Суѕ	Leu	Pro	Asp	Arg 215		Thr		Ala	S e r 2 2 0	Leu	Leu	Gln	Ala
G 1 y 2 2 5	Туr	Lys	Gly	Arg	V a l 2 3 0	Thr	Gly	Trp	G 1 y	A s n 2 3 5	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp 240
Thr	Ala	Asn	V a l	G 1 y 2 4 5				Pro		Val	Leu	Gln	Val	V a 1 2 5 5	Asn
Leu	Pro	lle	V a l 2 6 0	Glu	Arg	Pro	Val	C y s 265	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg 270	Ile	Arg
Ile	Thr	A s p 2 7 5		Met			A 1 a 2 8 0		Туr			A s p 2 8 5	Glu	Gly	Lys
Arg	G 1 y 2 9 0	Asp	Ala	Суѕ	Glu	G l y 295	Asp		Gly	Gly	Pro 300	Phe	Val	Met	Lys
3 0 5				Asn	3 1 0					3 1 5					3 2 0
				Arg 325					3 3 0					3 3 5	Phe
Arg	Leu	Lys	L y s 3 4 0	Trp	Ilе	Gln	Lys	V a l 3 4 5	lle	Asp	Gln	Phe	G 1 y 3 5 0	Glu	

【書類名】図面【図1】

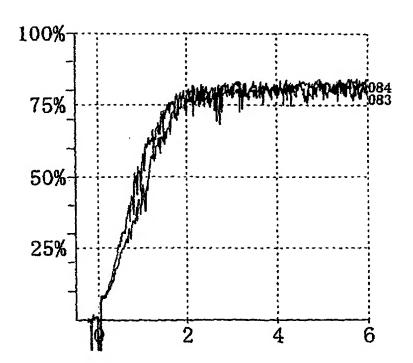


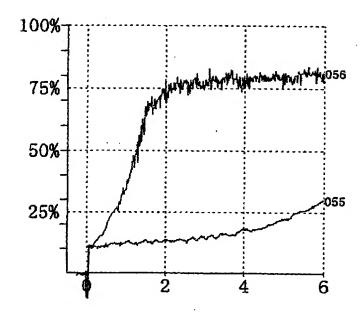
【図2】



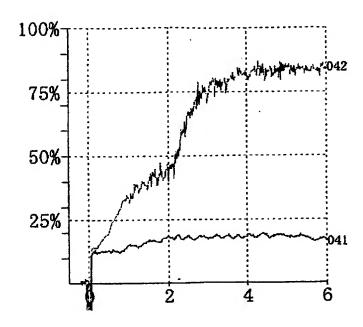


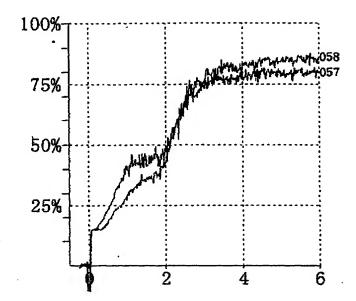
【図4】



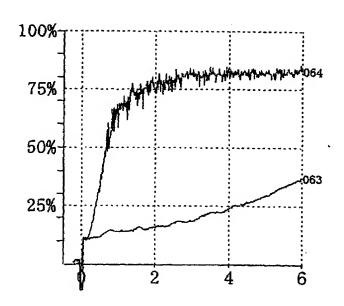


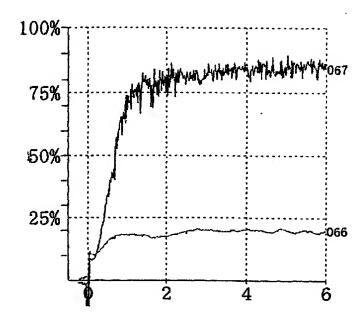
【図6】



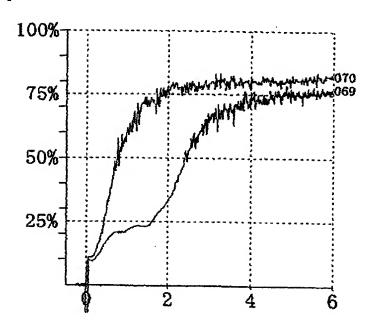


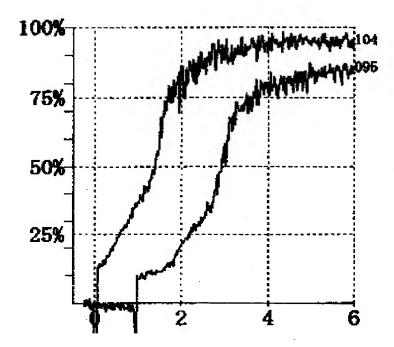
【図8】



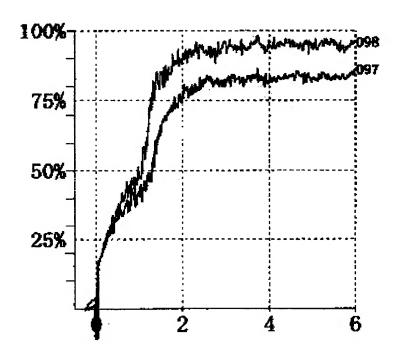


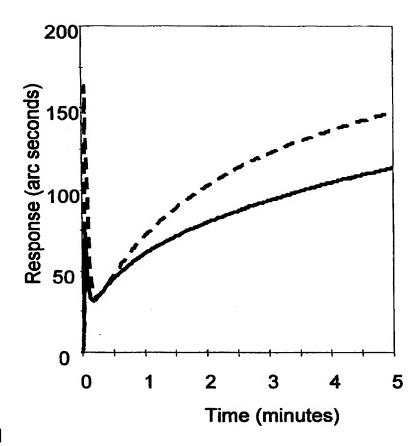
【図10】



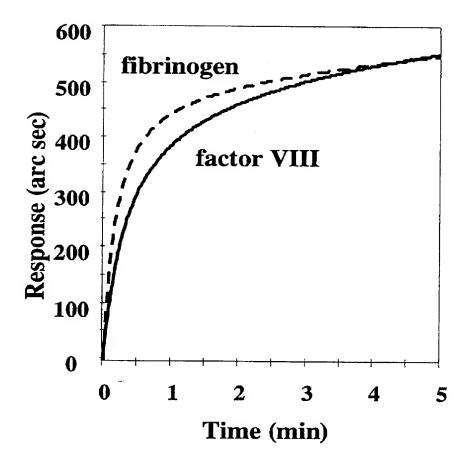


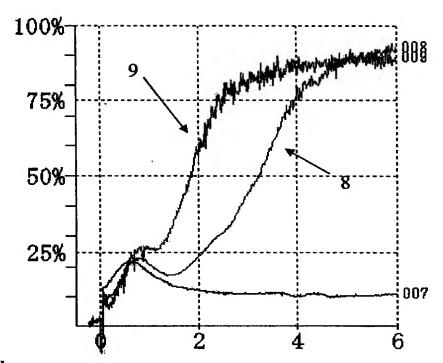
【図12】



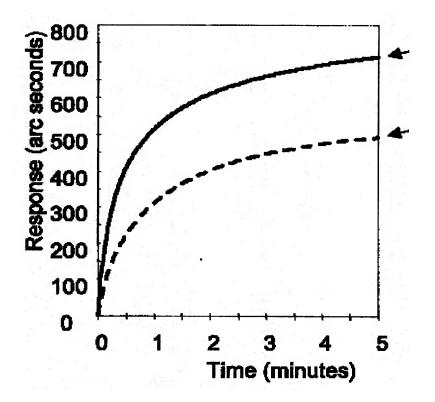


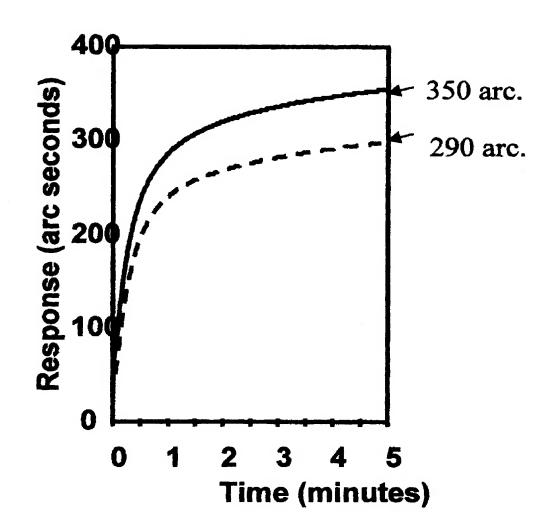
【図14】

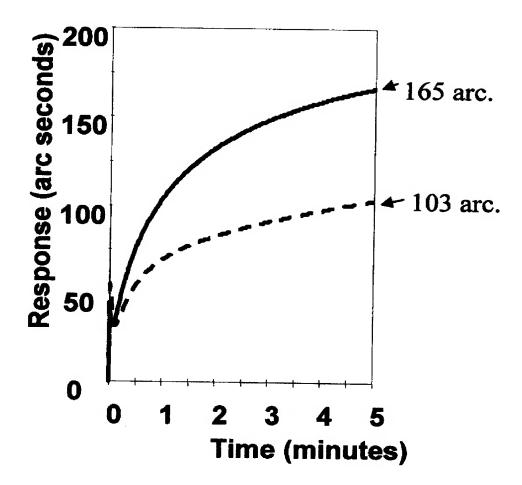


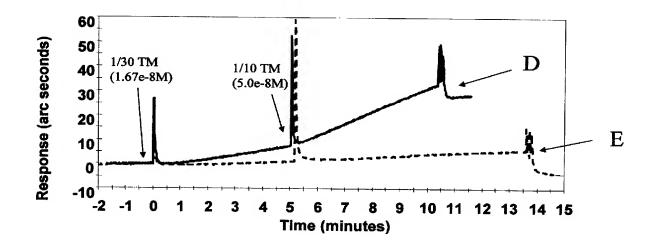


【図16】

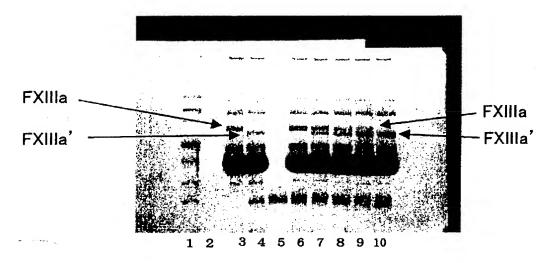


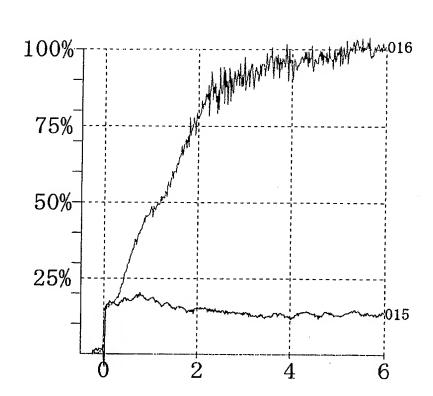




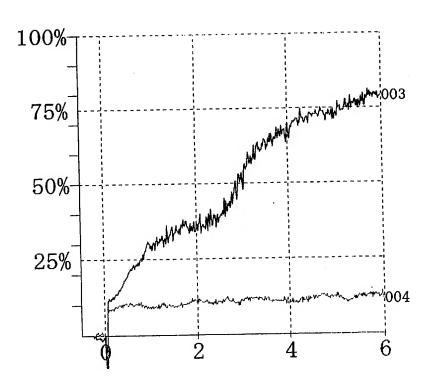


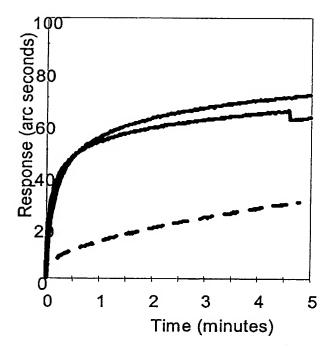
【図20】



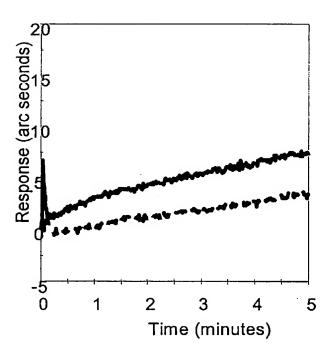


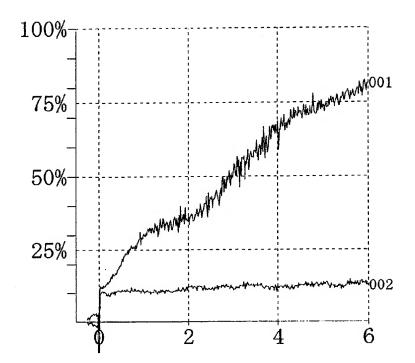
【図22】



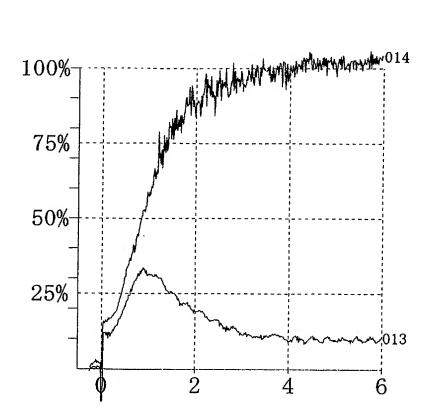


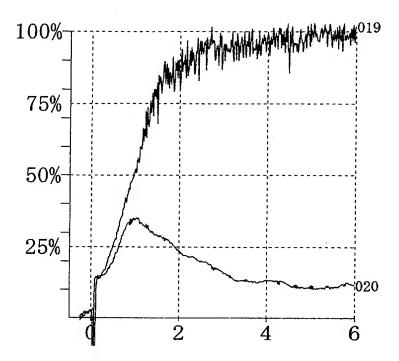
【図24】



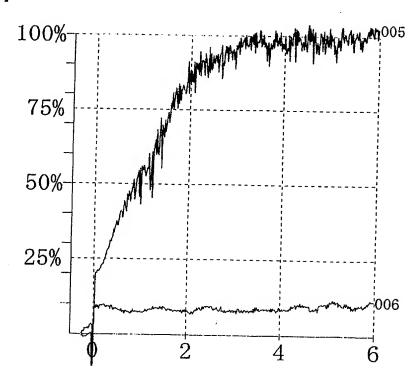


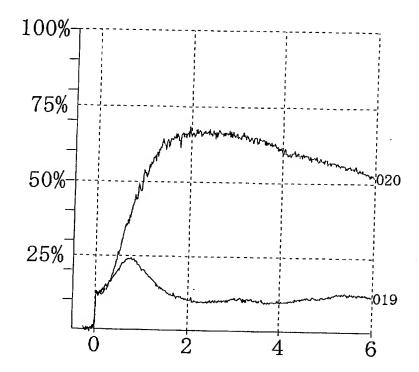
【図26】



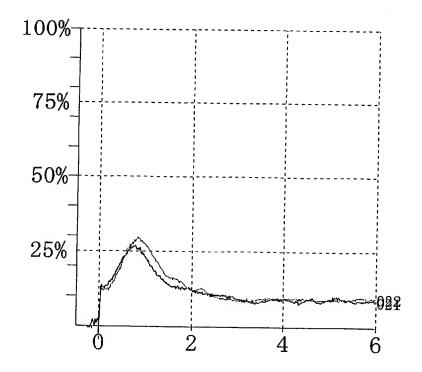


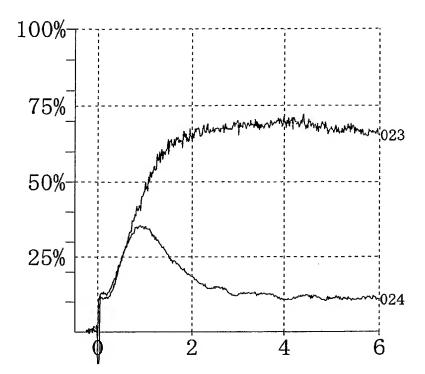
【図28】



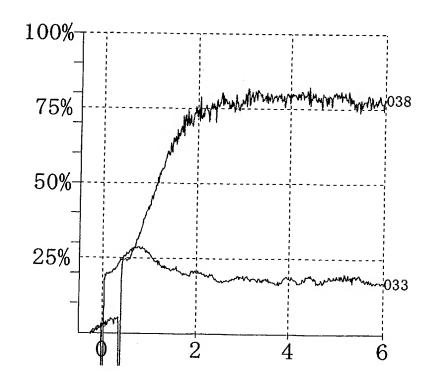


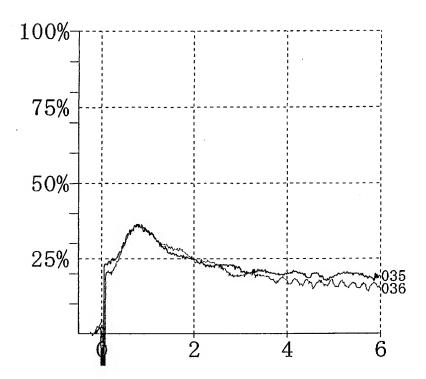
【図30】



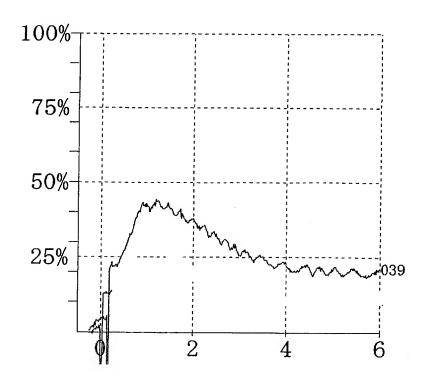


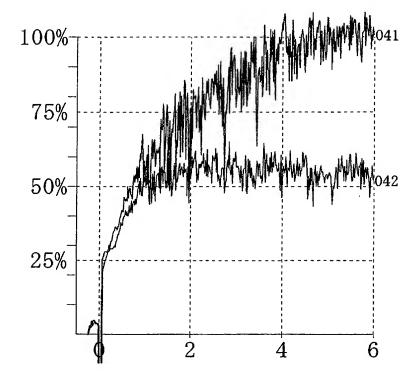
【図32】



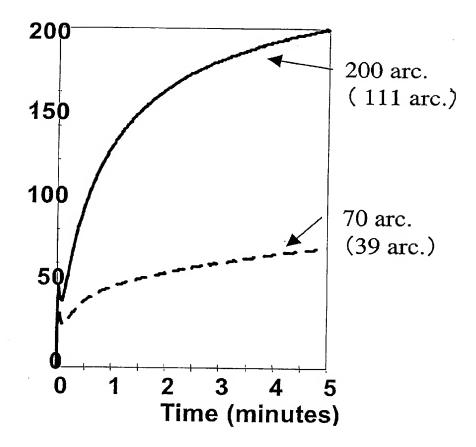


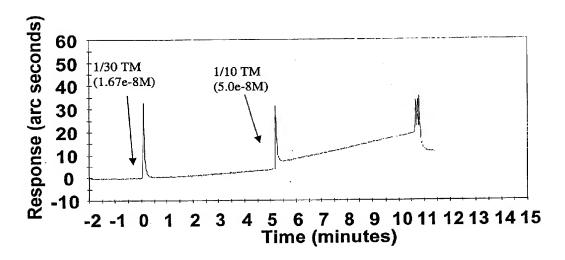
【図34】





【図36】





【書類名】要約書

【要約】

【課題】 抗血栓治療薬又は抗炎症治療薬として好適なトロンビン誘導体を提供する。

【解決手段】 トロンビンにアミノ酸置換を導入し、アミノ酸置換トロンビン誘導体の中から基質分解活性が低下し、かつ基質結合能を保持したトロンビン誘導体を選択する。 具体的にはB鎖203グリシン及びB鎖205セリン及びB鎖43ヒスチジン及び99アスパラギン酸が置換されたトロンビン誘導体及びそのカルボキシル基修飾体などを選択する。

【選択図】 図1

【書類名】 手続補正書 【整理番号】 P-C50037HI 【提出日】 平成17年 3月 2日 【あて先】 特許庁長官殿 【事件の表示】 【出願番号】 特願2005- 29360 【補正をする者】 【識別番号】 0 0 0 0 0 2 0 7 1 チッソ株式会社 【氏名又は名称】 【補正をする者】 【識別番号】 0 0 0 2 2 4 1 0 1 【氏名又は名称】 藤森工業株式会社 【代理人】 【識別番号】 100100549 【弁理士】 【氏名又は名称】 川口 嘉之 【発送番号】 0 1 6 4 8 5 【手続補正】 【補正対象書類名】 特許願 【補正対象項目名】 代理権を証明する書面 【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 委任状]

委 任 状

【添付書類】 029

・ 平成 /7 年 2月 /日

私は、

弁理士 川 口 嘉 之 氏 識別番号 100100549 倉 秀 実 氏 識別番号 100090516 弁理士 松 氏 弁理士 遠 山 勉 識別番号 100089244 を以て、代理人として下記事項を委任します。

記

1. 特許願

に関する手続

特願 2004 - 170346 特願 2004 - 80950 特願 2004 - 31563/ 特願 2004 -217834

1. 上記出願又は に基づく特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の規定による優先 権の主張及びその取下げ

- 1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
- 1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
- 1. 上記出願に係る特許権、実用新案権及び意匠権に基づく権利及びこれらに関 する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄
- 1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は実用新案登録に対する登 録異議の申立てに関する手続
- 1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録及び意匠登録に対する無 効審判の請求に関する手続
- 1. 上記出願に係る特許権に関する訂正審判の請求
- 1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
- 1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
- 1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住所 (居所)

氏名 (名称)

東京都中央区日本橋馬喰町1丁目4番16号 藤森工業株式会社 供職稅 藤森明彦

(代 表 者)



出願人履歴

0000000207119900823

大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号 チッソ株式会社 0000224101 19900830 新規登録 597072349

東京都中央区日本橋馬喰町1丁目4番16号藤森工業株式会社